



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

“INFLUÊNCIA DO USO DE FLUOROQUINOLONAS NO APARECIMENTO DE *Escherichia coli* E *Salmonella* spp. MULTIRRESISTENTES EM VITELOS”

Maria Madalena Gomes Ferreira Lopes Centeno

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Ana Cristina Gaspar Nunes Lobo Vilela
Doutor Miguel Luís Mendes Saraiva Lima
Doutora Maria Constança Matias Ferreira Pomba
Doutor George Thomas Stilwell

ORIENTADOR

Doutora Maria Constança Matias
Ferreira Pomba

CO-ORIENTADOR

Doutor Miguel Luís Mendes Saraiva Lima

2010
LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

“INFLUÊNCIA DO USO DE FLUOROQUINOLONAS NO APARECIMENTO DE *Escherichia coli* E *Salmonella* spp. MULTIRRESISTENTES EM VITELOS”

Maria Madalena Gomes Ferreira Lopes Centeno

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Ana Cristina Gaspar Nunes Lobo Vilela

Doutor Miguel Luís Mendes Saraiva Lima

Doutora Maria Constança Matias Ferreira Pomba

Doutor George Thomas Stilwell

ORIENTADOR

Doutora Maria Constança Matias

Ferreira Pomba

CO-ORIENTADOR

Doutor Miguel Luís Mendes Saraiva Lima

2010
LISBOA

AGRADECIMENTOS

À Professora Constança por ter aceite orientar a minha tese e ter tornado este projecto possível. Por todo o apoio e amizade, especialmente nos dias mais complicados.

Ao Professor Miguel Saraiva Lima por me ter aberto as portas a um estágio único e inesquecível.

Ao Sr. Joaquim José por entrar neste projecto e disponibilizar a sua exploração como local de estudo.

Ao Dr. Evaristo Silva, ao Dr. Jaime Ribeiro e a toda a equipa da Vet+ pela paciência e compreensão, pela ajuda e pelos ensinamentos.

À Felisbela e à Natacha pela ajuda que me deram no laboratório.

À Filipa Baptista pela ajuda na análise estatística do trabalho.

Ao Dr. Jorge Machado que me proporcionou a serotipagem dos isolados de *Salmonella* no Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA).

Ao Dr. João Santos, técnico do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, pela serotipificação das salmonelas isoladas neste trabalho.

Ao Professor Fernando Bernardo pelos artigos disponibilizados para a realização desta dissertação.

Aos meus Pais por tornarem o meu sonho realidade.

Aos meus “grandes e importantes” irmãos Joana, Tomás e Mariana e ao meu cunhado João.

Aos meus Tios, Teresa e Zé, pelo carinho e amizade ao longo destes anos todos.

E a todos os meus amigos mas em especial:

À Carmo e à Marta, por estarem sempre ao meu lado.

Ao António, pelo apoio e conselhos, pelas conversas e discussões.

À Inês, ao João e ao Luís pela amizade e pelas noitadas partilhadas nestes últimos 5 anos.

À Carolina, ao João Luís, à Ana Maria, à Ana Margarida, à Mafalda e ao Carlos Eduardo pela amizade e apoio incondicional.

Resumo

Influência do uso de fluoroquinolonas no aparecimento de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. multirresistentes em vitelos

Neste estudo, avaliou-se a influência da administração de enrofloxacina no leite (50mg/L) e a susceptibilidade dos isolados de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. obtidos a partir de fezes de vitelos saudáveis (n=106) de uma exploração no Alentejo. A cada vitelo foram recolhidas amostras às 2 (T0, antes da administração da enrofloxacina), às 6 (T1, após 3 administrações de 5 dias consecutivos intervaladas por 5 dias cada) e às 10 semanas de idade (T2). Entre Fevereiro e Maio de 2010, obtiveram-se 237 isolados de *E. coli* que foram identificados por PCR para o gene *gadA* (McDaniels et al., 1996) e 12 isolados de *Salmonella* spp. serotipificados de acordo com o esquema *Kauffmann-White*. Os testes de susceptibilidade foram efectuados através do método de difusão por discos com os seguintes antibióticos: enrofloxacina (5µg), ampicilina (10µg), amoxicilina/ácido clavulânico (20/10µg), ceftiofur (30µg), tetraciclina (30µg) e trimetoprim/sulfametoxazole (1,25/23,7µg) e os resultados interpretados de acordo com as normas M31-A3 (CLSI, 2008). As estirpes produtoras de ESBL foram detectadas pelo método de disco duplo para detecção de sinergias. Os dados foram analisados segundo o modelo de regressão logística (SAS v9.2 software). A resistência dos isolados de *E. coli* foi 69,23% (T0), 79,75% (T1) e 89,66% (T2) à ampicilina; 0%, 2,53% e 1,72% à amoxicilina/ácido clavulânico; 27,88%, 3,80% e 22,41% ao ceftiofur; 35,58%, 98,73% e 72,41% à enrofloxacina; 78,85%, 94,94% e 94,83% à tetraciclina e 64,42%, 77,22% e 70,69% ao trimetoprim/sulfametoxazole. Obteve-se 18,81% (T0), 0% (T1) e 19,29% (T2) de isolados resistentes ao ceftiofur e com sinergia e, por isso, produtores de ESBL's. Houve diferenças muito significativas ($p<0.001$) no aparecimento de estirpes de *E. coli* multirresistentes em T0, T1 e T2. Quanto à *Salmonella* spp. obteve-se uma prevalência em T0 de 4,7% (IC_{95%}: 2.0 – 10.6), 0% (IC_{95%}: 0.0 – 4.5) em T1 e 11,7% (IC_{95%}: 5.8 – 22.2) em T2. A serotipificação identificou 3 *Salmonella* Typhimurium, 1 *Salmonella* Dublin e 1 *Salmonella* Newport nos isolados de T0 e 7 *Salmonella* Dublin nos isolados de T2. A resistência dos isolados de *Salmonella* spp. foi: ampicilina – 80% (T0) e 0% (T2); amoxicilina/ácido clavulânico, ceftiofur e enrofloxacina - 0% em T0 e T2; tetraciclina - 80% e 42,86% e trimetoprim/sulfametoxazole - 20% e 0%. Não foi possível relacionar estatisticamente a influência das fluoroquinolonas com o aparecimento de isolados de *Salmonella* spp. multirresistente. Este estudo demonstra que há influência da exposição dos vitelos às fluoroquinolonas no aparecimento de *E. coli* multirresistente.

Palavras-chave: Fluoroquinolonas, Multirresistência, Vitelos, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., ESBL's.

Abstract

Influence of the use of fluoroquinolones in the appearance of multi-resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in calves

In this study the influence of enrofloxacin administration in milk (50 mg/L) and the susceptibility of *E. coli* and *Salmonella* spp. isolates from faeces samples of healthy calves (n=106) from a Portuguese farm were evaluated. Each calf was sampled at 2 (T0, before enrofloxacin administration), 6 (T1, after 3 administrations of 5 consecutive days with a 5 day interval each) and 10 weeks of age (T2). Between February and May 2010 we obtained 237 *E. coli* isolates that were identified by the *gadA* gene PCR (McDaniels et al., 1996) and 12 *Salmonella* spp. isolates that were serotyped according to the Kauffmann-White scheme. Antimicrobial susceptibility testing was done by the disk diffusion method with the following antimicrobials: enrofloxacin (5µg), ampicillin (10µg), amoxicillin/clavulanic acid (20/10µg), ceftiofur (30µg), tetracycline (30µg) and trimethoprim/sulfamethoxazole (1.25/23.7µg) and interpreted by the M31-A3 guidelines (CLSI, 2008). The ESBL-producing *E. coli* isolates were detected by the double disk diffusion test. Data was analysed by the logistic regression model (SAS v9.2 software). *E. coli* resistance to ampicillin was 69,23% (T0), 79,75% (T1) and 89,66 (T2); to amoxicillin/clavulanic acid 0,00%, 2,53% and 1,72%; to ceftiofur 27,88%, 3,80% and 22,41%; to enrofloxacin 35,58%, 98,73% and 72,41%; to tetracycline 78,85%, 94,94% and 94,83% and to trimethoprim/sulfamethoxazole 64,42%, 77,22% and 70,69%. 18.81% (T0), 0% (T1) and 19.3% (T2) were isolates resistant to ceftiofur and with synergy therefore ESBL-producing isolates. There was high significant difference ($P<0.001$) between multidrug-resistant strains raise in *E. coli* isolates from T0, T1 and T2.

As for the *Salmonella* spp. isolates we obtained a prevalence of 4,7% (IC_{95%}: 2.0 – 10.6) on T0, 0% (IC_{95%}: 0.0 – 4.5) on T1 and 11,7% (IC_{95%}: 5.8 – 22.2) on T2 moments. The serotipification identified 3 *Salmonella* Typhimurium, 1 *Salmonella* Dublin and 1 *Salmonella* Newport from T0 isolates and 7 *Salmonella* Dublin from T2 isolates. *Salmonella* spp. resistance after TSA was: ampicillin – 80% (T0) and 0% (T2); amoxicillin/ clavulanic acid, ceftiofur and enrofloxacin - 0% on both T0 and T2; tetracycline - 80% and 42,86% and trimethoprim/sulfamethoxazole - 20% and 0%. It was not possible to establish a statistic relation between the influence of fluoroquinolones and the appearance of multi-resistant *Salmonella* spp.

This study demonstrates that calves' exposure to fluoroquinolones influences the emergence of multidrug-resistance among *E. coli* isolates.

Keywords: Fluoroquinolones, multidrug-resistance, calves, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., ESBL.

ÍNDICE

Índice de Figuras	ix
Índice de Tabelas	xi
Lista de Abreviaturas	xiii
Prefácio	1
I – Introdução.....	3
1. As Fluoroquinolonas	4
2. <i>Escherichia coli</i>	9
2.1. <i>Escherichia coli</i> produtora de Beta-lactamases de Espectro Alargado	12
3. <i>Salmonella</i> spp.	13
II – Objectivos.....	19
III - Materiais e Métodos:	20
1. Caracterização da exploração	20
2. Colheita de amostras	21
3. <i>Escherichia coli</i> comensal	22
3.1. Isolamento de <i>Escherichia coli</i> comensal.....	22
3.2. Identificação de isolados de <i>Escherichia coli</i> comensal	23
3.2.1. Extracção de ADN.....	23
3.2.2. Identificação por PCR	23
3.3. Susceptibilidade aos Antibióticos	24
3.4. <i>Escherichia coli</i> produtoras de ESBL's.....	25
4. <i>Salmonella</i> spp.	26
4.1. Isolamento de <i>Salmonella</i> spp.....	26
4.2. Identificação de <i>Salmonella</i> spp.	28
4.3. Serotipificação de <i>Salmonella</i> spp.....	29
4.4. Susceptibilidade aos Antibióticos	30
5. Análise Estatística	31
IV - Resultados	32
1. <i>Escherichia coli</i>	32
1.1. Isolamento e Identificação de isolados de <i>Escherichia coli</i>	32
1.2. Susceptibilidade aos Antibióticos	34
1.3. <i>Escherichia coli</i> produtoras de ESBL's.....	38
2. <i>Salmonella</i> spp.	40
2.1. Isolamento e Identificação de <i>Salmonella</i> spp.	40
2.2. Serotipificação de isolados de <i>Salmonella</i> spp.	41
2.3. Susceptibilidade aos Antibióticos	42
V – Discussão.....	45
1. <i>Escherichia coli</i>	45
2. <i>Salmonella</i> spp.	52
VI – Conclusão	57
VII - Bibliografia	59
Anexos.....	65
Anexo I. Resumo das Actividades Realizadas durante o Estágio na Battenkill Veterinary Bovine, Nova Iorque, entre Outubro e Dezembro de 2009.	65
Anexo II. Resumo da comunicação livre apresentada nas XIV Jornadas da APB, Elvas, 2010.....	66
Anexo III. Resumo submetido para o IV Congresso ESCAIDE 2010, Lisboa, 2010	68
Anexo IV. Tabela de dados referentes os cento e seis vitelos amostrados no estudo: Número de Sistema de Identificação Animal, Data de Nascimento, Sexo e Origem	69
Anexo V. Tabela informativa sobre as datas de colheita, idade dos vitelos (em dias) nos momentos T0, T1 e T2 e intervalo (em dias) entre colheitas T0-T1 e T1-T2.	72

Anexo VI. Resultados dos testes de susceptibilidade a antibióticos das estirpes de <i>E. coli</i> em T0.....	77
Anexo VII. Resultados dos testes de susceptibilidade a antibióticos das estirpes de <i>E. coli</i> em T1.....	80
Anexo VIII. Resultados dos testes de susceptibilidade a antibióticos das estirpes de <i>E. coli</i> em T2.....	83
Anexo IX. Resultados dos testes de susceptibilidade a antibióticos dos 12 isolados de <i>Salmonella</i> spp.	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura Química das Principais Quinolonas, adaptado de S. Guimarães, D. Moura e P. Soares da Silva (2006).....	5
Figura 2. Níveis de resistência de <i>Escherichia coli</i> comensal à tetraciclina, ao cloranfenicol, à ampicilina, ao ceftiofur, ao cefotaxime, à sulfonamida, à gentamicina, à ciprofloxacina e ao ácido nalidíxico em bovinos, declarados por 8 Estados Membros no ano de 2007, adaptado de <i>The Community Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from animals and food in the European Union in 2004-2007</i> , EFSA, 2010	12
Figura 3. Distribuição dos dez serovars mais comuns de <i>Salmonella</i> em bovinos saudáveis em 2008 adaptado de <i>The Community Summary Report on Trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008</i> , EFSA, 2010	15
Figura 4. Níveis de resistência de <i>Salmonella</i> spp. à tetraciclina, ao cloranfenicol, à ampicilina, ao ceftiofur, ao cefotaxime, à sulfonamida, à gentamicina, à ciprofloxacina e ao ácido nalidíxico em bovinos, declarados por 11 Estados Membros no ano de 2007, adaptado de <i>The Community Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from animals and food in the European Union in 2004-2007</i> , EFSA, 2010	16
Figura 5. <i>Timeline</i> descritivo do projecto “Influência do Uso de Fluoroquinolonas no Aparecimento de <i>Salmonella</i> spp. e <i>Escherichia coli</i> Multirresistentes” a realizar.....	21
Figura 6. Protocolo laboratorial de isolamento de <i>E. coli</i> a partir de zaragatoas de fezes de vitelos.....	22
Figura 7. Sequência genómica do primer <i>gadA/B forward</i> e <i>reverse</i> utilizado para a realização do PCR para identificação dos isolados de <i>E. coli</i> segundo McDaniels <i>et al</i> (1996)	23
Figura 8. Protocolo Laboratorial para o isolamento e identificação de <i>Salmonella</i> spp. a partir de amostras de fezes de vitelos adaptado da ISO 6579:2002, anexo D.	27
Figura 9. Ocorrência de <i>Escherichia coli</i> nos três momentos de recolha T0, T1 e T2.....	32
Figura 10. Gel de Electroforese de produtos de amplificação do gene <i>gadA</i> por PCR de estirpes de <i>Escherichia coli</i> . M, DNA Ladder; 1, Controlo Negativo; 2, 3 e 4, Produtos de PCR amplificadas com primers do gene <i>gadA/B</i> ; 5, Controlo Positivo.	33
Figura 11. Susceptibilidade dos isolados de <i>Escherichia coli</i> aos diferentes antimicrobianos obtidos a partir de fezes de vitelos entre Fevereiro e Maio de 2010 nos tempos de recolha T0, T1 e T2, classificados em sensível (S), intermédio (I) ou resistente (R) após TSA.....	34
Figura 12. Padrões de Resistência observados nos isolados de <i>E. coli</i> obtidos em T0	36
Figura 13. Padrões de Resistência observados nos isolados de <i>E. coli</i> obtidos em T1	37
Figura 14. Padrões de Resistência observados nos isolados de <i>E. coli</i> obtidos em T2	37
Figura 15. Observação de sinergias pelo método de duplo disco, entre os discos de Ceftiofur e Amoxicilina/Ácido Clavulânico em placas de TSA de isolados de <i>E. coli</i>	39
Figura 16. Isolamento de <i>Salmonella</i> spp. em placa de “Modified Semi-Solid Rappaport Vassiliadis”.....	40

Figura 17. Serotipificação dos 12 isolados de <i>Salmonella</i> spp. obtidos a partir de fezes de vitelos saudáveis entre os meses de Fevereiro e Maio de 2010 através do método de aglutinação por antisoros da Biorad (Madrid, Espanha).....	42
Figura 18. Susceptibilidade dos isolados de <i>Salmonella</i> spp. aos diferentes antimicrobianos obtidos a partir de fezes de vitelos entre Fevereiro e Maio de 2010 nos tempos de recolha T0 e T2, classificados em sensível (S), intermédio (I) ou resistente (R) após TSA.	43

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Prevalência de <i>Salmonella</i> spp. em bovinos a partir de amostras de fezes de bovinos saudáveis no âmbito do programa de monitorização bacteriológica entre os anos de 2006 e 2008 adaptado de <i>The Community Summary Report on Trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008</i> , EFSA, 2010	15
Tabela 2. Susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados de <i>S. Enteritidis</i> e <i>S. Typhimurium</i> recolhidos de fezes de bovinos saudáveis na Finlândia no ano de 2008, adaptado de <i>Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic agents in humans, foodstuffs, animals and feedingstuffs in Finland, anexo ao relatório da EFSA, 2010</i>	17
Tabela 3. Esquema do programa realizado pelo termociclador para o PCR <i>gadA/B</i> utilizado pelo LRA, adaptado de McDaniels <i>et al</i> , 1996	24
Tabela 4. Método de difusão de discos: Antibióticos utilizados e critérios de avaliação segundo o <i>Clinical Laboratory Standards Institute</i> , 2008.	25
Tabela 5. Características de colónias de <i>Salmonella</i> spp. e outras bactérias em meio de “Hektoen Enteric Agar” (Scharlau, Barcelona, Espanha), adaptado de Domingos, 2010.	28
Tabela 6. Parâmetros para a identificação de diferentes bactérias em meio de TSI Agar, adaptado de Domingos, 2010.....	29
Tabela 7. Amostras de fezes com resultado negativo a <i>E. coli</i> em MacConkey Agar ou após PCR com posterior API 20E para identificação do isolado.....	33
Tabela 8. Resultados do modelo de regressão logística para a associação entre a exposição às fluoroquinolonas e a resistência a diferentes antimicrobianos em 237 isolados de <i>Escherichia coli</i> entre Fevereiro e Maio de 2010.....	35
Tabela 9. Resultado do modelo de regressão logística exacta para a associação entre a exposição às fluoroquinolonas e a resistência à enrofloxacina em 237 isolados de <i>Escherichia coli</i> entre Fevereiro e Maio de 2010.....	35
Tabela 10. Resultados do modelo de regressão logística exacta para a associação entre a exposição às fluoroquinolonas e o aparecimento de multiresistência em 237 isolados de <i>Escherichia coli</i> entre Fevereiro e Maio de 2010.....	38
Tabela 11. Tabela Comparativa entre o aparecimento de sinergias e a ocorrência de resistência ao ceftiofur na placa de TSA nos isolados de <i>Escherichia coli</i>	39
Tabela 12. Prevalência da <i>Salmonella</i> spp. em 247 amostras de fezes de vitelos recolhidas em três tempos distintos durante os meses de Fevereiro a Maio de 2010 numa exploração no Alentejo.	41
Tabela 13. Padrões de Resistência observados nos diferentes serótipos de <i>Salmonella</i> spp. isolados nos momentos T0 e T2 a partir de fezes de vitelos.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS

APB – Associação Portuguesa de Buiatria

ADN / DNA – Ácido desoxirribonucleico / Desoxyribonucleic acid

AM – Antimicrobianos

Amc – Amoxicilina / Ácido Clavulânico

Amp – Ampicilina

CIM – Concentração Inibitória Mínima

DGV – Direcção Geral de Veterinária

dNTP – “Deoxynucleotide triphosphates” / Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados

ECDC – European Centre for Disease Prevention and Control

EFSA – European Food Safety Authority

EMA – European Medicines Agency

Enr – Enrofloxacin

ESBL – Expanded Spectrum Beta-lactamases

ESCAIDE – European Scientific Conference on Applied Infectious Diseases Epidemiology

FMV – Faculdade de Medicina Veterinária

LRA – Laboratório de Resistência aos Antibióticos e Biocidas

MSRV – “Modified Semi-solid Rappaport Vassiliadis”

OMS / WHO – Organização Mundial de Saúde / World Health Organization

PCR – Polymerase Chain Reaction

QRDR – Quinolone Resistance Determining Region

Sxt – Trimetoprim / Sulfametoxazole

Te – Tetraciclina

TSA – Teste de Sensibilidade aos Antibióticos

TSI – Triple Sugar Iron

Xnl – Ceftiofur

PREFÁCIO

Em Outubro de 2009 dei início ao meu estágio curricular na clínica Battenkill Veterinary Bovine, em Greenwich no estado de Nova Iorque. Este estado na costa Este dos Estados Unidos da América é maioritariamente uma zona de explorações leiteiras de raça *Frísia-Holstein* e *Jersey*, sendo a sua clínica a base do meu trabalho. Além da clínica de bovinos de leite, trabalhei também com bovinos de carne da raça *Angus* e *Hereford*, porcos domésticos (Porco do Vietname ou *Potbellied Pig*) e cabras.

No caso dos bovinos de leite, o meu trabalho diário consistiu no acompanhamento dos programas reprodutivos e de sanidade das explorações, fazendo diagnóstico de gestação por palpação rectal ou por ecografia transrectal e pondo em prática os planos de sincronização de estro. Além deste trabalho diário, prestava também assistência nas urgências (Ver Anexo I. Resumo das actividades realizadas durante o Estágio na Battenkill Veterinary Bovine, Nova Iorque, entre Outubro e Dezembro de 2009).

Durante o meu estágio assisti e resolvi vários casos em bovinos, nomeadamente resolução cirúrgica de deslocamentos de abomaso à esquerda e à direita (a urgência mais frequente), abscessos, partos distócicos por desproporção feto-materno e torção uterina, fetotomias, cesarianas, mastites, metrites, prolapsos uterinos, patologia respiratória, patologia neurológica, vacas caídas por hipocalcémia e lesão do nervo ciático por compressão e úlceras abomasais. Assisti também a casos de vitelos com quadros de diarreia e choque anafilático a vacinas. Realizei castrações em vitelos e bodes, descornas e resolução de hérnias umbilicais.

Particularmente interessante foram os dois casos de intoxicação que surgiram enquanto estive na clínica. O primeiro foi um caso de 10 cabras intoxicadas pela ingestão da flor de rododendro, uma planta tóxica devido ao acetilandromedrol, uma graianotoxina. O segundo caso foi uma intoxicação por chumbo, com consequente morte, de 4 vitelos da raça *Jersey*. Os painéis das suas boxes continham teores muito elevados deste metal e, ao lambar estes painéis, os vitelos ingeriram quantidades letais de chumbo.

O meu estágio teve sem dúvida um balanço muito positivo, uma vez que tive a possibilidade de integrar uma equipa de profissionais que se mostraram sempre disponíveis para me ajudar e ensinar.

Na sequência do meu trabalho para a minha dissertação de mestrado em Portugal, fiz uma breve apresentação dos resultados preliminares nas XIV Jornadas da Associação Portuguesa de Buiatria em Abril de 2010, que se realizaram em Elvas (Anexo II) e submeti um resumo para o IV Congresso ESCAIDE que se realizará em Lisboa em Novembro de 2010 (Anexo III).

I – INTRODUÇÃO

Uma consequência inevitável no uso de antimicrobianos é o aparecimento e disseminação de bactérias resistentes e a transmissão entre bactérias de genes de resistência (Fàbrega, Sánchez-Céspedes, Soto & Vila, 2008). Nos dias de hoje, os sistemas de produção intensiva de bovinos, com elevada carga animal, são favoráveis ao desenvolvimento de afecções que, consequentemente, obrigam ao recurso a antimicrobianos quer com fins terapêuticos, quer profilaticamente, criando condições ideais de pressão selectiva nas bactérias. O uso de antibióticos pode não influenciar directamente o aparecimento de resistências ao nível das bactérias mas cria um ambiente com uma pressão selectiva que favorece o aparecimento de tais resistências. O crescente desenvolvimento de resistências pode vir a ter graves consequências a nível de saúde e bem-estar animal e graves perdas económicas para o produtor, uma vez que a eficácia dos antibióticos começa a diminuir. Este aumento de resistências representa também um grande risco na saúde pública, pois a perda de eficácia das moléculas antimicrobianas pode também afectar a eficácia na terapêutica humana (European Medicine Agency [EMA], 2006).

Suspeita-se que as explorações intensivas de bovinos de hoje recorram a uma administração abusiva de antimicrobianos como meio para obter o máximo rendimento possível dos animais uma vez que se observa um melhor índice de conversão, maior ganho de peso e menor taxas de morbilidade e mortalidade (Berge, Lindeque, Moore & Sisco, 2005). Esta aplicação abusiva de antimicrobianos recai sobre 3 tipos de categorias: terapêutica, com o único objectivo de tratar um animal ou grupo de animais doentes; metafilática que consiste numa medicação de grupo com doses terapêuticas em casos onde haja animais a exibir sintomas de doença; e profilática com o objectivo de evitar o aparecimento de doença através da administração prolongada de doses subterapêuticas a todo o efectivo. Há ainda outra utilização possível de antimicrobianos: a utilização *off-label* ou *extra-label* que consiste na sua utilização de qualquer outra forma que não a prescrita no resumo das características do medicamento. É de notar que a utilização de um antimicrobiano como promotor de crescimento em animais de produção com o intuito de se obter um melhor índice de conversão alimentar e, consequentemente, um melhor ganho médio diário de peso, acelerando o crescimento dos animais foi proibida pela União Europeia em 1999 (Prescott, 2008).

A pressão selectiva imposta pela utilização de antimicrobianos promove o aparecimento de bactérias resistentes por dois motivos. O primeiro motivo sugere que, ao haver uma pressão selectiva, haverá uma disseminação preferencial das bactérias resistentes pela existência de uma vantagem competitiva sobre as bactérias susceptíveis e o segundo motivo afirma que a existência de uma pressão selectiva vai facilitar a disseminação de possíveis genes de resistência entre as bactérias (Call, Davis & Sawant, 2008).

Organizações europeias como a *European Food Safety Authority* (EFSA) em associação com a *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) desenvolveram programas de monitorização para aplicação nos diferentes países europeus com o objectivo de controlar a prevalência de bactérias resistentes quer zoonóticas como a *Salmonella* spp. quer indicadoras como a *Escherichia coli* comensal, publicando anualmente um relatório com os dados recolhidos (European Food Safety Authority [EFSA], 2010b).

A importância de bactérias comensais como a *E. coli* baseia-se na particularidade de estas poderem desenvolver mecanismos de resistência quando são expostas a agentes microbianos e passarem a agir como reservatório podendo transmitir horizontalmente essas mesmas resistências a agentes patogénicos (Fàbrega *et al*, 2008). Por sua vez, bactérias como a *Salmonella* spp. ganham importância por serem bactérias zoonóticas e, neste caso particular, a segunda zoonose mais reportada em humanos no ano de 2008 pondo em risco a saúde pública (EFSA, 2010b). Segundo van den Bogaard e os seus colaboradores (2000), encontraram-se evidências da presença de genes de resistência a antibióticos de uso exclusivo em animais não só em bactérias exclusivas dos animais como também na microbiota comensal do homem e em bactérias exclusivamente humanas como a *Shigella*. Porém convém reforçar a ideia que a influência do uso de antimicrobianos em animais de produção no aparecimento de multirresistências em humanos ainda não está completamente demonstrada (Azevedo, Maia & Tavares, 2010).

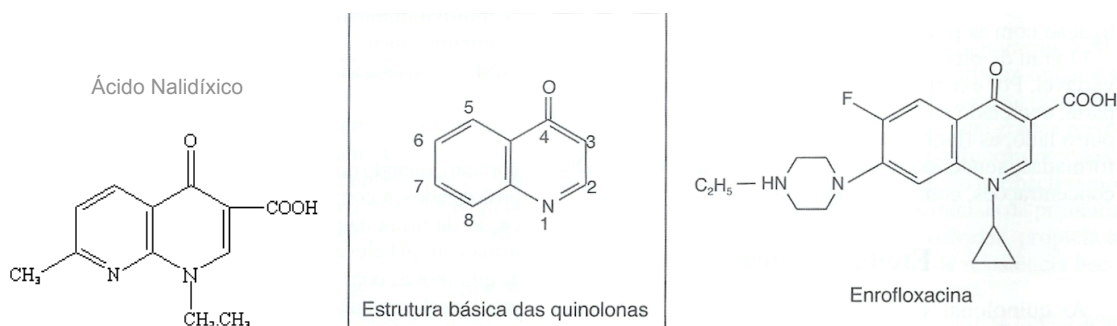
1. As Fluoroquinolonas

O uso de antimicrobianos da classe das fluoroquinolonas em animais de produção ganhou particular atenção uma vez que esta classe é classificada como “criticamente importante” pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Segundo a OMS, além das fluoroquinolonas, também as cefalosporinas de 3ª e 4ª geração e os macrólidos são classes de antibióticos considerados criticamente importantes uma vez que: a) o princípio activo ou classe de antibióticos é a única terapia possível ou uma das poucas para infecções graves em humanos e b) o antimicrobiano ou classe é usado para o tratamento de doenças causadas por microrganismos transmitidos através de fontes não humanas ou doenças causadas por microrganismos que podem adquirir genes de resistência a partir de fontes não humanas (World Health Organization [WHO], *List of Critically Important Antimicrobials*, Copenhaga, Dinamarca, 2009).

A primeira quinolona a ser desenvolvida surgiu durante a produção de um fármaco contra a malária e recebeu o nome de ácido nalidíxico. Formada por uma estrutura base de 4 anéis, o espectro de acção desta molécula bactericida restringe-se às *Enterobacteriaceae*, com grandes limitações a nível de absorção e distribuição pelo organismo. As fluoroquinolonas

(Figura 1) derivam das quinolonas de primeira geração e ganham o seu nome pela adição de um átomo de flúor na posição 6 do seu anel base 4-quinolona de forma a melhorar não só o seu espectro de acção mas também a sua farmacocinética comparativamente a compostos como o ácido nalidíxico. Foram introduzidas no mercado no fim dos anos 80 e início dos anos 90, sendo a enrofloxacin a primeira fluoroquinolona a ser aprovada para uso veterinário. Ganharam popularidade pelo seu grande espectro de acção contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, particularmente contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycoplasma* e *Chlamydia* (Walker & Dowling, 2006). Além do espectro de acção muito mais largo, as fluoroquinolonas apresentam uma actividade antibacteriana intrínseca muito intensa, uma boa difusão para os tecidos, incluindo os líquidos intracelulares (devido a uma melhor penetrabilidade de membrana), um tempo de semi-vida elevado e uma menor toxicidade (Guimarães, 2006).

Figura 1. Estrutura Química das Principais Quinolonas, adaptado de S. Guimarães, D. Moura e P. Soares da Silva (2006).



O seu mecanismo de acção consiste na inibição de duas enzimas, a topoisomerase II (ou ADN *girase*), constituída por 2 subunidades *gyrA* e *gyrB* e a topoisomerase IV, constituída pelas subunidades *parC* e *parE*, necessárias ao processo de replicação do ADN bacteriano. As topoisomerases são responsáveis pelo relaxamento e separação da dupla cadeia de ADN da bactéria e pelo enrolamento das cadeias novas de modo a permitir a transcrição e replicação do ADN para as células-filhas. As fluoroquinolonas bloqueiam a síntese do ADN bacteriano ao ligarem-se à subunidade A da ADN *girase*, impedindo a catalização do super enrolamento negativo da molécula de ADN o que leva à fragmentação do ADN e consequente morte da bactéria. Ao inibirem a topoisomerase IV, as fluoroquinolonas interferem com a separação das duplas cadeias de ADN e na remoção dos super enrolamentos positivos e negativos do ADN. A inibição da subunidade A da ADN *girase* é o mecanismo de acção mais frequente das fluoroquinolonas sobre as bactérias mas no caso

de bactérias Gram-positivas, a inibição da topoisomerase IV é o mecanismo com maior importância (Fàbrega *et al*, 2008; Baptista, 2007).

As fluoroquinolonas demonstram boa actividade contra a maioria das bactérias Gram-negativas, especialmente da família *Enterobacteriaceae*. No entanto, no caso das bactérias Gram-positivas as fluoroquinolonas têm um espectro de acção um pouco mais variável, dependendo do antimicrobiano em questão. Quanto mais recente for o antimicrobiano maior é o seu espectro de acção, porém elementos da mesma geração também demonstram diferenças no seu nível de acção. Por exemplo, a ciprofloxacina é mais indicada do que qualquer outra fluoroquinolona da sua geração para o tratamento de *Pseudomonas aeruginosa* (Papich & Riviere, 2001).

Em Portugal as (fluoro)quinolonas autorizadas para uso nas espécies pecuárias, mais especificamente em bovinos, são a danofloxacina, a enrofloxacina e a flumequina. A danofloxacina, comercializada sob o nome de Advocin 180[®] (Laboratórios Pfizer), e a enrofloxacina, comercializada sob diferentes nomes comerciais como Baytril One[®], 5%[®] ou 10%[®] (Laboratórios Bayer) ou Alsir 5%[®] (Laboratórios Esteve Farma) apresentam indicações terapêuticas muito semelhantes. Ambas as fluoroquinolonas são indicadas para o tratamento de doenças respiratórias causadas por *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni* e *Mycoplasma* spp., para o tratamento de mastites por *Escherichia coli* e também para colidiarreia, colisepticémia e salmonelose. São especificamente indicadas para o tratamento de infecções entéricas causadas por *E. coli* em vitelos recém-nascidos. No caso particular do Alsir 5%[®], a indicação terapêutica é pouco específica, estando indicado para as afecções por microorganismos sensíveis à enrofloxacina dos aparelhos digestivo, respiratório, urinário, reprodutor e tecidos moles (Direcção Geral de Veterinária [DGV], 2010).

A exposição dos animais a baixas doses de fluoroquinolonas (doses subterapêuticas), geralmente administradas por via da água, do leite ou do alimento composto, aumenta a probabilidade de se desenvolverem resistências nas bactérias expostas (WHO, 1998). Este assunto é muito controverso porque há quem defenda a importância de administrações de doses subterapêuticas de antibióticos como meio de controlo de patologias e outros que defendem que este uso inadequado de fármacos só leva ao agravamento do problema das multirresistências, particularmente a nível de saúde pública (Berge *et al*, 2006). Muitos estudos já foram realizados com o intuito de determinar qual é a verdadeira relação entre a administração de antimicrobianos em animais de produção e o aumento das resistências em medicina humana, mas não se obtiveram resultados suficientemente concretos para se estabelecer uma relação de causa-efeito (Azevedo *et al*, 2010). Segundo Call e os seus colegas, a remoção completa dos antimicrobianos da produção animal iria levar, a longo prazo, à diminuição da transmissão de bactérias com resistências para a população humana. Porém, a suspensão do uso de antimicrobianos em animais de produção iria

diminuir a saúde animal, traduzindo-se numa maior morbilidade e mortalidade, o que levaria ao aumento da probabilidade de exposição do homem a verdadeiros agentes patogénicos, uma vez que se aumentaria a carga patogénica nos animais (Call *et al*, 2008).

Uma das grandes desvantagens do uso intensivo de fluoroquinolonas é a facilidade de aparecimento de resistências a nível das bactérias. Geralmente, uma bactéria resistente a uma fluoroquinolona é também resistente às restantes fluoroquinolonas (resistência cruzada), quer seja de uso exclusivo veterinário, quer seja de uso exclusivo em humanos (WHO, 1998). Estas resistências podem ser mediadas por genes a nível cromossómico ou mediadas por plamídeos, elementos genéticos móveis (Li, 2005). Os genes a nível cromossómico podem sofrer diferentes mutações, descritas em seguida por ordem crescente de importância:

- 1) Mutação ao nível do gene que codifica para as porinas (proteínas específicas da membrana celular exterior da bactéria) originando uma diminuição na permeabilidade da membrana celular da bactéria levando à diminuição do fluxo de entrada do antimicrobiano para o interior da célula.
- 2) Mutação ao nível do gene que codifica para as proteínas reguladoras das bombas de efluxo levando a uma sobreexpressão do gene, aumentando o fluxo de saída do antimicrobiano do interior da célula para o exterior por transporte activo, diminuindo o tempo de permanência deste no interior da bactéria e consequentemente diminuindo o seu tempo de acção.
- 3) Aquisição de mutações ao nível dos genes que codificam para as subunidades das enzimas das bactérias (genes *gyrA* e *B* e genes *parC* e *E*) leva a alterações ao nível dos locais de ligação da molécula antimicrobiana ao complexo enzima/ADN, impedindo a sua ligação à cadeia de ADN.

As mutações mais frequentes ocorrem a nível da enzima tetramérica ADN girase, primariamente no gene *gyrA*, numa pequena região chamada de região determinante de resistência às quinolonas (“Quinolone Resistance Determining Region”) ou QRDR que se encontra entre os codões que codificam os aminoácidos para a subunidade A da enzima. Os restantes genes para as subunidades das enzimas em questão (*gyrB*, *parC* e *parE*) também apresentam a região QRDR mas mutações nestes genes são menos frequentes, sendo que mutações no gene *parC* são mais frequentes que nos restantes 2, uma vez que se comporta como homólogo do gene da subunidade A da ADN girase (Fàbrega, *et al.*, 2008; Li, 2005).

O nível de resistência que as bactérias desenvolvem ao antimicrobiano depende especificamente da bactéria em questão. No caso de *Pseudomonas aeruginosa* uma mutação ao nível do gene *gyrA* é suficiente para torná-la resistente à fluoroquinolona, porém bactérias como *E. coli* ou *Salmonella* spp. necessitam de várias mutações para desenvolverem uma resistência com significado clínico (Li, 2005).

Particularmente no caso de *E. coli*, a ocorrência de uma mutação no gene *gyrA* ou no seu homólogo *parC* corresponde a um nível de resistência baixo às fluoroquinolonas, traduzindo-se por um aumento no valor da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da fluoroquinolona testada. Estas *Enterobacteriaceas* atingem um nível elevado de resistência quando sofrem pelo menos 3 mutações, duas no gene *gyrA* e uma no gene *parC*, ou uma no gene *gyrA* e duas no gene *parC* (Lindgren *et al.*, 2003). Bactérias que apresentem mutações ao nível do gene *gyrA* facilmente desenvolvem um segundo mecanismo de resistência (Ruiz *et al.*, 2002).

Por definição um plasmídeo é um elemento genético móvel que se encontra no interior de uma bactéria, independente do ADN cromossómico desta, com capacidade própria para se replicar e para se transmitir quando há contacto entre bactérias. Estes elementos apresentam ainda a característica de transportar no seu material genético genes que conferem à bactéria onde se encontram resistência a um ou mais antimicrobianos. Estes plasmídeos são denominados de resistentes ou plasmídeos R e são um mecanismo muito eficiente na transmissão horizontal e vertical de genes de resistência a antimicrobianos entre diferentes espécies de bactérias (Li, 2005; Singer & Berg, 1991).

A primeira menção à existência de um plasmídeo com capacidade de transmitir resistência foi feita em 1987 onde se descreveu a passagem da resistência ao ácido nalidíxico de um exemplar de *Shigella dysenteriae* para *E. coli*. Apesar desta descoberta ter sido posteriormente refutada, ainda há dúvidas se houve ou não interferência de um plasmídeo na transmissão da resistência. Em Julho de 1994 isolou-se uma estirpe de *Klebsiella pneumoniae* a partir da urina de um paciente na Universidade de Alabama que, em 1998, Martinez-Martinez e colaboradores demonstraram transmitir resistência às quinolonas a outras estirpes por via de plasmídeos (Li, 2005; Martinez-Martinez *et al.*, 1998; Paterson, 2006). Martínez-Martinez *et al* também observaram que mesmo que o plasmídeo só tivesse concedido à bactéria um nível baixo de resistência às fluoroquinolonas, esta resistência iria permitir uma selecção para o aparecimento de maiores resistências através do estímulo a mutações espontâneas. De tal forma que, uma estirpe de *E. coli* portadora do plasmídeo estudado (pMG252) por si só era considerada sensível à ciprofloxacina. A sua importância residia nas interacções entre o gene de resistência do plasmídeo e as mutações cromossómicas espontâneas que podiam ocorrer, levando a uma maior selecção desta estirpe com alterações. Ele determinou que a frequência de mutações espontâneas em isolados de *E. coli* era 100 vezes mais frequente na presença do plasmídeo do que na sua ausência. (Martinez-Martinez *et al.*, 1998).

Depois de 1998, diversos trabalhos foram publicados confirmando a presença de um gene no genoma de plasmídeos – o gene *qnrA* – que garante às *Enterobacteriaceae* uma resistência traduzida por um aumento de 8 a 32 vezes nas CIMs das quinolonas. É também

a presença deste gene que vai facilitar a selecção de estirpes com mutações cromossómicas quando se encontram na presença de quinolonas (Robicsek *et al*, 2005).

O gene *qnrA* codifica uma proteína da família dos pentapéptidos, a Qnr, constituída por 218 aminoácidos repetidos em tandem. Esta proteína tem como função proteger as topoisomerases ADN *girase* e topoisomerase IV da acção inibitória das quinolonas, fornecendo à bactéria um mecanismo de resistência. O *qnr* estabelece especificamente resistência ao ácido nalidíxico mas apenas aumenta as CIMs das fluoroquinolonas até 32 vezes (Jacoby, Chow & Waites, 2003; Poirel *et al*, 2005). A protecção exercida pela proteína Qnr sobre a ADN *girase*, enzima alvo das quinolonas nas bactérias Gram-negativas, foi demonstrada *in vitro* num estudo de 2002 e determinou-se que o grau de protecção sobre a ADN *girase* é proporcional à concentração de Qnr na bactéria e inversamente proporcional à concentração de ciprofloxacina no interior da bactéria. Pensou-se que a proteína também tinha alguma acção de protecção sobre a topoisomerase IV da *E. coli*, alvo secundário das quinolonas, mas neste estudo não foi possível provar a ideia. O mecanismo de acção da proteína Qnr é ainda desconhecido (Tran & Jacoby, 2002).

Como foi referido anteriormente, um plasmídeo não transporta apenas um gene de resistência no seu genoma. No caso do plasmídeo pMG252, estudado no trabalho de Martinez-Martinez *et al* em 1998, este transmitia à bactéria multirresistência uma vez que não continha apenas o gene *qnrA* de resistência às quinolonas mas também genes codificadores de beta-lactamases (Li, 2005). Segundo Paterson (2006), isolados de *E. coli* e de *K. pneumoniae* apresentam um maior nível de resistência às quinolonas quando são produtores de ESBL's. Também Hawkey e Jones (2009) demonstraram que um grau elevado de resistência às fluoroquinolonas está associado à resistência a cefalosporinas devido à co-existência de genes de resistência em plasmídeos. Num estudo sobre a prevalência do gene *qnrA* nos Estados Unidos, Robicsek e os seus colegas determinaram que 10% dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* e 17% dos isolados de *Enterobacter* resistentes à ceftazidima expressavam o gene de resistência às quinolonas (Robicsek *et al*, 2005).

Ao permitir o desenvolvimento de resistências em bactérias transmissíveis ao homem, o uso inadequado das fluoroquinolonas toma uma posição muito importante na sociedade dos dias de hoje, sendo cada vez mais frequente as acções de sensibilização sobre o uso de antimicrobianos.

2. *Escherichia coli*

Escherichia coli foi descrita pela primeira vez em 1885 por Theodor Escherich que lhe atribuiu o nome de *Bacterium coli commune*. Em 1895, Migula alterou-lhe o nome para

Bacillus coli, sendo mais tarde alterado para *Escherichia coli* por Castellani e Chalmers em 1919 (Cowan, 1974). Só em 1935 é que se descobriu que variantes desta bactéria, que se pensava ser simplesmente comensal do tracto intestinal dos animais, tinham capacidades para provocar surtos de diarreia em crianças. Determinou-se que um indivíduo, animal ou humano, é colonizado pela bactéria poucas horas depois de nascer através da água, do alimento ou por contacto com o meio envolvente.

E. coli comensal enquadra-se na família *Enterobacteriaceae* e trata-se de um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo, fermentador da lactose que habita o tracto intestinal de animais saudáveis. No entanto, nem todos os elementos da família *Enterobacteriaceae* são agentes comensais como *Escherichia coli*, *Klebsiella* ou *Enterobacter*. Há bactérias que são agentes patogénicos como *Salmonella*, *Shigella* e *Yersinia*. Isto não exclui de modo algum a capacidade de alguns agentes comensais de provocarem doença, agindo como agentes patogénicos oportunistas e originando infecções em locais extra intestinais como o tracto urinário ou as glândulas mamárias (Quinn *et al*, 2002). É também importante notar que diferentes estirpes de bactérias comensais podem ser consideradas como agentes patogénicos, uma vez que causam doença.

As bactérias comensais actuam como reservatório de genes de resistência a antibióticos correndo o risco de transmitirem esses genes a agentes patogénicos que entrem em contacto com elas. Por este motivo, consideram-se as bactérias comensais como boas indicadoras do nível de pressão selectiva imposta nos animais pelo uso de antibióticos e qual o nível de resistência que se pode esperar nos agentes patogénicos. Ao analisar a prevalência da resistência na microbiota comensal de diferentes animais e na população humana, torna-se possível comparar essa prevalência entre espécies e identificar transferências de resistência entre bactérias (van den Bogaard, 2000).

Num estudo de 2006, Berge e colaboradores avaliaram a influência da administração profilática de um antimicrobiano (tetraciclina) por via do leite e da administração terapêutica de ceftiofur em vitelos no aparecimento de isolados de *E. coli* comensal multirresistente. Ficou, assim, provado que a exposição dos animais a um determinado antimicrobiano levou ao desenvolvimento de resistências nos isolados a mais do que um tipo de antimicrobiano. Houve uma pressão selectiva para a ocorrência de *E. coli* multirresistente, surgindo 55% dos isolados multirresistentes (resistência a 2 ou mais antimicrobianos), 6% resistentes a um antimicrobiano e apenas 39% dos isolados provaram ser sensíveis.

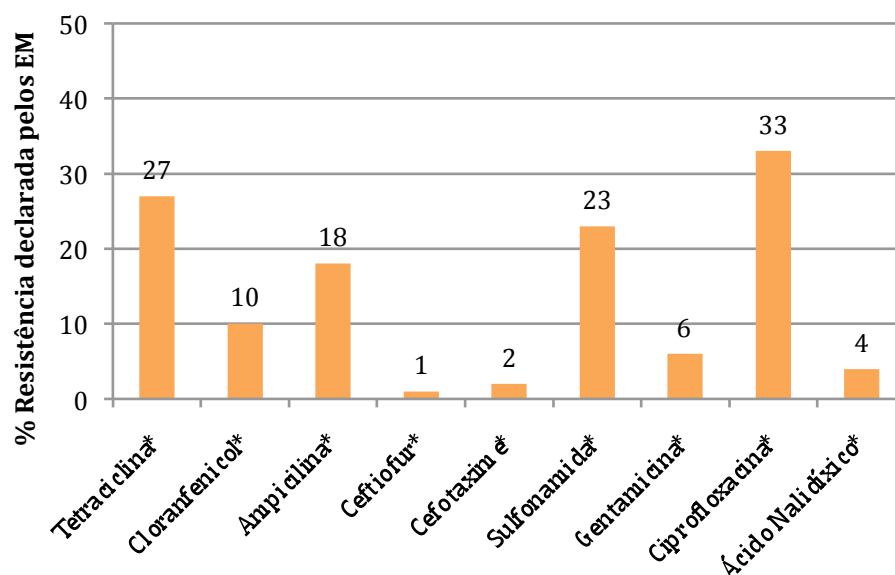
É importante demonstrar que o inverso também pode ocorrer, ou seja, a remoção da fonte de pressão selectiva (exposição a antimicrobianos) pode levar ao aumento de susceptibilidade nas bactérias comensais intestinais. O estudo de Kaneene e dos seus colaboradores (2008) demonstra isso mesmo. Kaneene propôs-se avaliar se a remoção da exposição subterapêutica dos vitelos à tetraciclina e à neomicina iria aumentar a susceptibilidade dos isolados de *E. coli* e *Salmonella* spp aos antimicrobianos. Antes da

suspensão da exposição foram recolhidas várias amostras de fezes e verificou-se que os isolados obtidos nestas amostras de *E. coli* e *Salmonella* spp. evidenciaram uma elevada resistência à tetraciclina (>77%) mas os isolados obtidos após a remoção do antimicrobiano demonstraram um aumento significativo na sua susceptibilidade. Concluiu-se então que a interrupção da exposição a antimicrobianos resulta num aumento significativo de sensibilidade das bactérias tanto comensais como patogénicas.

Outro método de estudo para avaliar a prevalência de resistências em *E. coli* comensal é comparar explorações convencionais com explorações orgânicas, onde a exposição a antimicrobianos é muito mais reduzida. Sato, Bartlett e Saeed (2005) verificaram que os isolados de *E. coli* de explorações convencionais de bovinos apresentaram valores significativamente mais elevados de resistência do que as explorações orgânicas a 7 dos 17 antimicrobianos testados (ampicilina, estreptomicina, canamicina, gentamicina, cloranfenicol, tetraciclina e sulfametoxazole). Estudos semelhantes foram realizados em explorações de suínos, atingindo as mesmas conclusões obtidas nos estudos em bovinos (Nulsen, Mor & Lawton, 2008). Porém, apesar de explorações orgânicas estarem associadas a baixas prevalências de resistências a antimicrobianos, as bactérias que desenvolveram resistências persistem durante muitos anos nestas explorações, mesmo que não haja administração de antimicrobianos, o que faz sobressair o facto de que não é só a pressão selectiva imposta pelos antimicrobianos que faz surgir as resistências em bactérias (Call *et al*, 2008).

Face à crescente importância do tema em questão, a EFSA, em conjunto com o ECDC, iniciou uma rede de monitorização da prevalência das resistências de agentes patogénicos e elementos indicadores aos antimicrobianos, com base nos dados reportados pelos Estados Membros. Em 2010 a EFSA publicou um relatório sobre a prevalência das resistências entre os anos de 2004 e 2007 na União Europeia para diferentes espécies animais. Na figura 2 estão representados os valores de resistência de *Escherichia coli* comensal de bovinos no ano de 2007 a 9 antimicrobianos diferentes, reportados por 8 Estados Membros.

Figura 2. Níveis de resistência de *Escherichia coli* comensal à tetraciclina, ao cloranfenicol, à ampicilina, ao ceftiofur, ao cefotaxime, à sulfonamida, à gentamicina, à ciprofloxacina e ao ácido nalidíxico em bovinos, declarados por 8 Estados Membros no ano de 2007, adaptado de *The Community Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from animals and food in the European Union in 2004-2007*, EFSA, 2010



* N° de isolados (n) Tetraciclina – 1138; Cloranfenicol – 1132; Ampicilina – 983; Ceftiofur – 248; Cefotaxime – 761; Sulfonamida – 1139; Gentamicina – 886; Ciprofloxacina – 701; Ácido Nalidíxico – 1138.

Durante a última década o aparecimento de bactérias resistentes a estes antimicrobianos tem vindo a aumentar rapidamente e bactérias como a *E. coli* comensal e a *Salmonella* spp. são agora alvo de elevada monitorização (EMEA, 2009).

2.1. *Escherichia coli* produtora de Beta-lactamases de Espectro Alargado

As beta-lactamases de espectro alargado representam um grupo de enzimas produzidas por bactérias, especialmente bactérias Gram-negativas, com capacidade para conferir resistência à ampicilina, à amoxicilina e a outras penicilinas, às cefalosporinas de terceira geração e outras mais antigas e também ao aztreonam, mas são inibidas por inibidores de beta-lactamases como o ácido clavulânico. Estas bactérias denominam-se bactérias produtoras de beta-lactamases de espectro alargado (ESBL's) de classe A, segundo a classificação de Ambler (Ambler, 1980). O aparecimento de ESBL's é geralmente mediada por plasmídeos, distinguindo-se das beta-lactamases que são produzidas intrinsecamente pelas bactérias por estarem codificadas a nível cromossómico e que conferem uma resistência intrínseca aos antimicrobianos (Paterson, 2006; Susić, 2004). Estes plasmídeos

que transportam os genes das ESBL's frequentemente transportam também outros genes que codificam para a resistência a diferentes classes de antimicrobianos, como os aminoglicosídeos ou as fluoroquinolonas (Paterson & Bonomo, 2005).

O desenvolvimento de resistências às cefalosporinas de 3ª e 4ª geração, classe de antimicrobianos classificada com “criticamente importante”, está a ganhar importância dentro da comunidade médica, uma vez que se tem observado o aparecimento de bactérias produtoras de beta-lactamases que destroem o anel β -lactâmico, inativando a cefalosporina.

Torna-se portanto muito importante a monitorização de *Escherichia coli* comensal, uma vez que ela própria, pertencente à família das Enterobacteriaceae, pode produzir ESBL's ou então actua como fonte de transmissão dos genes de resistência. O gene de resistência identificado em plasmídeos aumenta o risco de transmissão a humanos e pode aumentar a resistência às fluoroquinolonas, pois o mesmo plasmídeo pode transmitir o gene de resistência para ambas as classes antimicrobianas (EMEA, 2009). O aparecimento destas enzimas demonstra a grande capacidade que as bactérias, especificamente as Gram-negativas, têm para desenvolver mecanismos de resistência quando expostos a novos agentes antimicrobianos (Paterson & Bonomo, 2005).

3. *Salmonella* spp.

Tal como a *Escherichia coli*, a *Salmonella* faz parte da família Enterobacteriaceae, tratando-se de uma bactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa, não fermentadora da lactose.

Observou-se pela primeira vez um isolado de *Salmonella* em 1880 por Eberth no baço e linfonodos mesentéricos de um paciente que morreu com febre tifóide mas foi só em 1891 que Jensen isolou pela primeira vez um exemplar de *Salmonella* em bovinos (Wray & Davies, 2000). Em Portugal isolou-se a primeira salmonela em bovinos em 1929 a partir de vísceras de uma vitela com suspeita de enterite infecciosa, só se voltando a isolar outra salmonela em 1937 novamente a partir de vísceras de vitela. Em 1943 isolou-se a primeira salmonela a partir de fezes de bovino adulto na região de Vila Franca de Xira (Machado, 1946).

A nomenclatura da espécie *Salmonella* é muito complexa e não está completamente estabelecida devido à descoberta de novos serovars todos os anos. Citando Tindall, esta atingiu um ponto pouco satisfatório com duas linhas diferentes de nomenclatura em circulação: um sistema proposto por Le Minor e Popoff durante os anos 80 e um outro sistema, menos utilizado, que se baseia no Código Bacteriológico (Tindall *et al*, 2005). O género *Salmonella* encontra-se actualmente dividido em 2 espécies: *S. bongori* e *S. enterica*, sendo que esta última se encontra dividida em 6 subespécies. A maioria das

salmonelas isoladas em animais pertencem à subespécie *S. enterica* subsp. *enterica*, mas há mais de 2500 serovares de *Salmonella* identificados e a sua prevalência muda de ano para ano (EFSA, 2010b).

A *Salmonella* é um agente patogénico zoonótico importante, ubiquitário e que utiliza o tracto intestinal dos animais domésticos e selvagens como reservatório. Estes hospedeiros-reservatório disseminam a bactéria através das suas fezes, contaminando a água, o solo e os alimentos, onde a bactéria sobrevive durante longos períodos de tempo (Angulo *et al*, 2000). A transmissão deste agente zoonótico pode ocorrer por contacto directo animal-homem, animal-animal ou mesmo homem-homem em países sub-desenvolvidos através de fezes contaminadas ou por introdução dos agentes nas áreas de produção alimentar (EFSA, 2010b).

Em vitelos, a expressão clínica da doença pode adquirir a forma respiratória mas a mais comum é a forma entérica caracterizada por febre, apatia, perda de apetite e diarreia com muco ou até sangue. Os vitelos rapidamente apresentam-se desidratados e com baixa condição corporal acompanhado por uma elevada taxa de mortalidade. As infecções subclínicas são as mais comuns, onde o agente patogénico facilmente se dissemina sem sinais clínicos, originando hospedeiros intermitentes ou persistentes (EFSA, 2010b; Wray & Davies, 2000).

No ano de 2008, a salmonelose foi novamente a segunda zoonose mais reportada pela EFSA, demonstrando a importância que recai sobre a monitorização da prevalência desta bactéria especialmente nos animais de produção, uma vez que estes são a maior fonte de contaminação para os humanos. Em 2004 registaram-se 195 947 casos de salmonelose em humanos tendo-se observado uma diminuição ao longo dos anos atingindo os 131 468 casos em 2008, causados principalmente por *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (EFSA, 2010a). No último relatório emitido pela EFSA, vinte países incluíram no seu relatório anual de monitorização de zoonoses dados sobre a salmonelose. Destes vinte países, apenas 4 apresentaram resultados baseados em amostras de fezes colhidas de animais saudáveis nas explorações. Os restantes 16 obtiveram os seus dados com base em amostras de fezes de animais doentes ou de órgãos recolhidos em matadouro. A Estónia e a Finlândia apresentaram os seus valores de prevalência referentes aos anos de 2006, 2007 e 2008 mas a Itália e a Holanda apenas têm dados referentes ao ano de 2008. Na tabela 1 estão representados os valores de prevalência de *Salmonella* spp. nestes 4 países para os anos entre 2006 e 2008.

Tabela 1. Prevalência de *Salmonella* spp. em bovinos a partir de amostras de fezes de bovinos saudáveis no âmbito do programa de monitorização bacteriológica entre os anos de 2006 e 2008 adaptado de *The Community Summary Report on Trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008*, EFSA, 2010

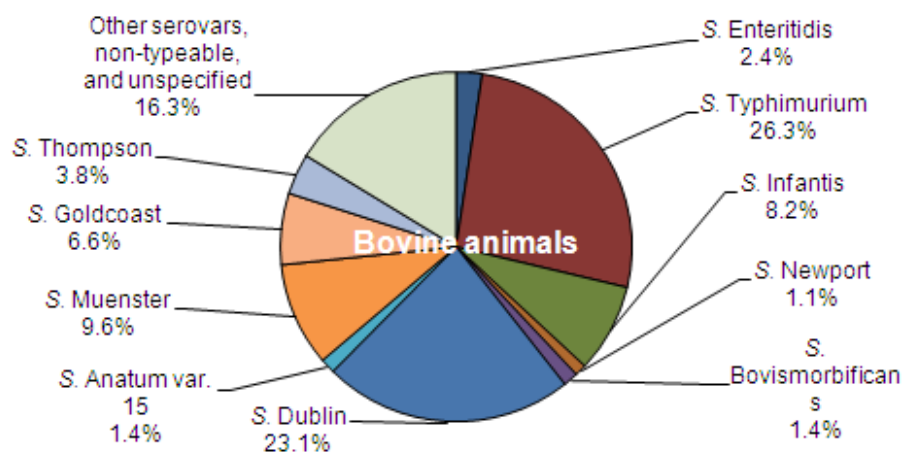
	2006	2007	2008
Estónia	<0.1% (1213) ^a	0.8% (1302)	0.2% (1607)
Finlândia	0% (205)	0.4% (281)	0.4% (246)
Itália	-	-	5.4% (707)
Holanda	-	-	2% (1716)

^a Tamanho da amostra (n)

Como se pode observar pela tabela, a prevalência de *Salmonella* spp. nunca ultrapassou os 10%, estando bem abaixo deste valor (valor máximo de 5.4% em Itália). Em Portugal foram analisadas 39 amostras para pesquisa de *Salmonella* spp. no ano de 2008. Destas 39, 35 eram referentes a bovinos adultos e 4 a bovinos com menos de um ano de vida. Apenas as 4 amostras dos vitelos deram positivo a *Salmonella* spp. (EFSA, 2010).

A maioria dos isolados relativos ao ano de 2008 foi submetida a serotipificação permitindo concluir que o serovar mais comum em bovinos nesse ano na União Europeia foi *S. Typhimurium* seguido por *S. Dublin*, tal como demonstra a figura 3.

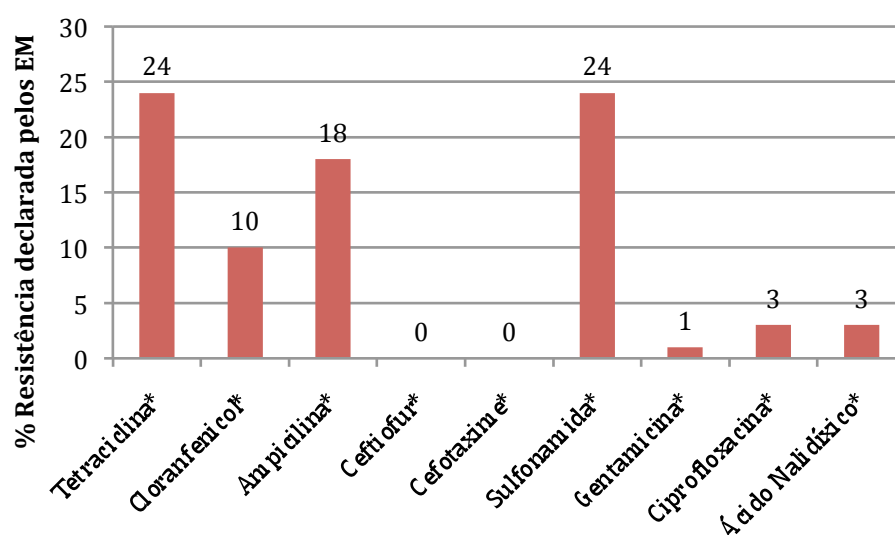
Figura 3. Distribuição dos dez serovars mais comuns de *Salmonella* em bovinos saudáveis em 2008 adaptado de *The Community Summary Report on Trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008*, EFSA, 2010



Apesar de na generalidade a *S. Typhimurium* surgir como serovar mais frequente em gado bovino, os dados facultados por cada país individualmente são diferentes. Enquanto que a Áustria, a República Checa, a Dinamarca, a Finlândia, a Alemanha, a Eslováquia e a Suécia confirmaram uma maior frequência de *S. Typhimurium*, a Bélgica, a Estónia, a Irlanda, a Holanda e o Reino Unido declararam que o serovar mais frequente foi *S. Dublin*. No entanto o serovar mais frequente nas infeções em humanos em 2008, a *S. Enteritidis*, foi pouco prevalente na espécie bovina, concluindo-se que a principal fonte de salmonelose em humanos não foi de origem bovina mas sim através de ovos e carne de aviário, uma vez que este serovar foi o mais comum na espécie aviária.

Independentemente da origem da infeção em humanos, a aplicação de um tratamento eficaz é de máxima importância, exacerbando a importância do estudo das resistências da salmonela aos diferentes antimicrobianos. De tal forma que a EFSA compilou num relatório dados de 11 estados membros sobre o panorama das resistências da salmonela aos antimicrobianos entre os anos de 2004 e 2007. Na figura 4 estão representadas as percentagens de resistência a 9 antimicrobianos de *Salmonella* spp. no ano de 2007.

Figura 4. Níveis de resistência de *Salmonella* spp. à tetraciclina, ao cloranfenicol, à ampicilina, ao ceftiofur, ao cefotaxime, à sulfonamida, à gentamicina, à ciprofloxacina e ao ácido nalidíxico em bovinos, declarados por 11 Estados Membros no ano de 2007, adaptado de *The Community Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from animals and food in the European Union in 2004-2007*, EFSA, 2010



* N° de isolados (n) Tetraciclina – 287; Cloranfenicol – 278; Ampicilina – 244; Ceftiofur – 26; Cefotaxime – 183; Sulfonamida – 278; Gentamicina – 289; Ciprofloxacina – 196; Ácido Nalidíxico – 279.

No relatório individual da Finlândia de 2008 (EFSAa, 2010), avaliou-se a susceptibilidade a 10 antimicrobianos de 4 serovares diferentes de *Salmonella* spp. – *S. Enteritidis*, *S. Konstanz*, *S. Panama* e *S. Typhimurium*. Tanto o isolado de *S. Konstanz* como o isolado de *S. Panama* surgiram sensíveis a todos os antimicrobianos testados. Porém o mesmo não se verificou com os restantes 2 serovares. Na tabela 2 demonstra-se a incidência de resistências por antimicrobiano e por padrão de resistência dos dois serovares.

Tabela 2. Susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* recolhidos de fezes de bovinos saudáveis na Finlândia no ano de 2008, adaptado de *Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic agents in humans, foodstuffs, animals and feedingstuffs in Finland, anexo ao relatório da EFSA, 2010*

	S. Enteritidis <i>n</i> = 1	S. Typhimurium <i>n</i> = 8
Gentamicina	0	0
Estreptomicina	0	0
Cloranfenicol	0	2
Cefotaxim	0	0
Ciprofloxacina	1	0
Ampicilina	0	3
Ácido Nalidíxico	1	0
Sulfametoxazole	0	3
Tetraciclina	0	2
Trimetoprim	0	2
Sensível	0	5
Resistente a 1 AM	0	0
Resistente a 2 AM	1	1
Resistente a 3 AM	0	0
Resistente a 4 AM	0	0
Resistente a >4 AM	0	2

n – nº de isolados testados; AM - Antimicrobianos

É de observar que na Finlândia, no ano de 2008, as maiores resistências detectadas em isolados de salmonela são mais uma vez aos antimicrobianos que apresentaram maiores resistências no ano de 2007 – tetraciclina, cloranfenicol, ampicilina e sulfonamidas.

Na Alemanha, no ano de 1988, verificou-se um aumento de estirpes de salmonela resistentes ao ácido nalidíxico associado à introdução da enrofloxacina no mercado alemão. A prevalência de resistências desta bactéria atingiu os 50% em vitelos numa área específica do país. Este mesmo fenómeno de aumento de resistências ao ácido nalidíxico foi também observado em França, em Espanha e no Reino Unido (EMEA, 2006), havendo portanto uma associação temporal entre o aparecimento de resistências em *Salmonella* spp. e a introdução de fluoroquinolonas na clínica de animais de produção.

O aparecimento de resistências em *Salmonella* spp. por acção da utilização de antimicrobianos pode também ser avaliada por comparação entre explorações leiteiras e explorações de bovinos de carne em modo extensivo e também comparando explorações convencionais com explorações orgânicas. É de conhecimento geral que bovinos de engorda em modo extensivo têm uma menor exposição a antimicrobianos do que bovinos de leite que são mantidos num modo intensivo. Davis e os seus companheiros (2007) provaram que bovinos de carne apresentavam menor prevalência de *S. Dublin* resistente a antimicrobianos do que bovinos de leite, pois sendo um serovar específico de bovinos, a diferença de prevalência só poderia ser causada pela diferença de pressão selectiva imposta sobre os animais, uma vez que bovinos de carne são criados com uma mínima exposição a antimicrobianos (Davis, Hancock, Besser, Daniels, Baker & Call, 2007).

No ano de 2002 foi reportado que 83% das explorações de recria nos Estados Unidos usavam antimicrobianos profilaticamente ou como promotores de crescimento. Nesse mesmo ano, um estudo efectuado em explorações de recria declarou que 95% dos isolados de *Salmonella enterica* eram susceptíveis a todos os antimicrobianos testados. Porém, contraditoriamente, um estudo em Dakota do Norte reportou que nenhum dos 112 isolados de *Salmonella enterica* era susceptível a todos os antimicrobianos testados (Call *et al*, 2008).

A falta de concordância entre os diferentes estudos efectuados sobre as resistências aos antimicrobianos faz crescer a importância e a necessidade de se atingir um consenso neste assunto de modo a evitar o aumento de resistências e manter a eficácia do máximo de antimicrobianos possível, uma vez que nas últimas décadas não se tem feito grandes avanços na descoberta de novas moléculas antimicrobianas.

II – OBJECTIVOS

Devido à crescente problemática do desenvolvimento de multirresistências a antimicrobianos criticamente importantes, este trabalho foi desenvolvido na Faculdade de Medicina Veterinária com o intuito de avaliar a influência do uso *off-label* de antimicrobianos no aparecimento de isolados de *Escherichia coli* comensal e *Salmonella* spp. multirresistentes.

Pretendeu-se:

- Observar a influência da administração de enrofloxacin *off-label* na população bacteriana intestinal de vitelos ao avaliar o desenvolvimento das resistências de *Escherichia coli* comensal e *Salmonella* spp. a diferentes antimicrobianos a partir de amostras de fezes recolhidas às 2 (T0, antes da administração da enrofloxacin), às 6 (T1, após 3 administrações de 5 dias consecutivos intervaladas por 5 dias cada) e às 10 semanas de idade (T2).
- Estudar a prevalência de *Salmonella* spp. numa exploração de recria em Portugal.
- Estudar a prevalência de *Escherichia coli* comensal produtora de beta-lactamases de espectro alargado por métodos fenotípicos.

1. Caracterização da exploração

Para a realização deste trabalho recolheram-se amostras de vitelos saudáveis de raça Frísia de uma só exploração. A exploração em questão localiza-se em Montemor-o-Novo, distrito de Évora, sendo uma exploração exclusivamente de recria, recebendo os animais por volta dos 15 dias de vida e vendendo-os por volta dos 3 meses. Os vitelos são mantidos em boxes individuais com cama de palha, ao nível do chão, dentro de um pavilhão coberto que foi desenvolvido a partir de uma estufa pré-existente na exploração, denotando-se graves problemas de arejamento e de temperatura no seu interior. As boxes são colocadas lado a lado possibilitando o contacto entre os vitelos, sendo estes distribuídos aleatoriamente conforme vão chegando, geralmente para ocupar boxes já vazias. De acordo com o seu tamanho são posteriormente agrupados em pequenos grupos de 5 vitelos e colocados em parques dentro do mesmo pavilhão, de modo a homogeneizar o lote. Aqui iniciam o processo de desmame, mudando a sua alimentação para uma alimentação exclusivamente à base de alimento composto em pó até atingirem o peso e tamanho ideal para serem vendidos.

A sua alimentação consiste na ingestão de 2 a 3 litros de leite de substituição (Naturmilk®) três vezes por dia, água *ad libitum* (no mesmo balde onde põem o leite de substituição) e alimento composto em pó não medicado (RAP 308 farinha – Rações Raporal®) desde o momento em que dão entrada na exploração. Conforme vão crescendo, o número de tomas de leite por dia vai diminuindo até atingir o desmame.

A exploração segue um plano de administração de enrofloxacin *off-label* com o objectivo de diminuir a prevalência de patologias do foro respiratório e gastrointestinal, nomeadamente diarreias. Este plano consiste na administração de enrofloxacin (Roxacin® - Laboratorios Calier, S.A, Barcelona, Espanha – 100mg de enrofloxacin por cada 1000ml) em doses terapêuticas por via oral, durante três períodos de cinco dias consecutivos, intervalados de 5 dias cada. O antibiótico é administrado no leite de substituição na dose de 10mg/KgPV.

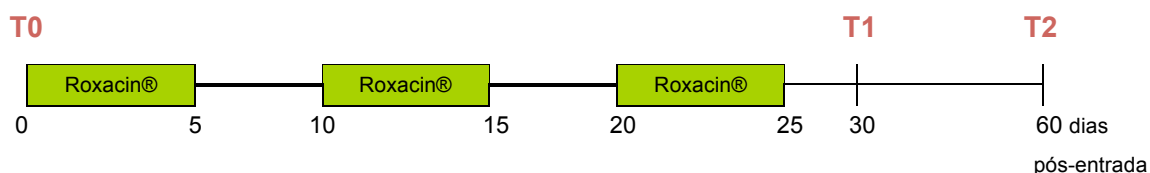
Segundo os dados de anos anteriores, a exploração apresenta uma taxa de mortalidade de aproximadamente 10% mas com previsão a aumentar devido ao Inverno rigoroso que se fez sentir.

O lote de animais que constituiu o grupo de estudo apresentava-se saudável à chegada à exploração, podendo alguns elementos apresentar apenas uma ligeira apatia devido ao transporte. Não se registou ao longo do estudo nenhum caso de diarreia digna de tratamento antimicrobiano, porém houve um grave surto respiratório no pavilhão que afectou muitos vitelos aumentando a taxa de mortalidade esperada para o trabalho.

2. Colheita de amostras

Na planificação do projecto calculou-se uma amostra de 100 animais ($n = 100$) para uma prevalência esperada de *Salmonella* spp. de 10%, uma margem de erro de 5% e um intervalo de confiança de 95%. Projectou-se fazer 3 recolhas a cada animal. Uma recolha em tempo zero (T0), prévia ao início da administração do antibiótico, uma segunda recolha (T1) logo após a aplicação do plano profilático e uma terceira recolha (T2) um mês após o fim do plano (Figura 5). Aos 15 dias de vida do vitelo, aos 45 dias e aos 75 dias, respectivamente.

Figura 5. *Timeline* descritivo do projecto “Influência do uso de Fluoroquinolonas no aparecimento de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* multirresistentes” a realizar.



No entanto, amostrou-se 106 animais (Anexo IV) e destes, apenas sessenta foram acompanhados nos três momentos do estudo, visto que se verificou uma taxa de mortalidade muito elevada durante os meses de Fevereiro a Maio. Do momento inicial para o momento T1 observou-se uma mortalidade de 25 animais (23,58%) e de T1 para o momento final morreram 21 vitelos (25,92%). A mortalidade destes animais foi devido ao surto respiratório que se verificou no pavilhão onde se encontravam os animais em estudo, causando uma taxa de mortalidade bastante mais elevada do que aquela prevista inicialmente.

A recolha em T0 foi efectuada aos 106 animais com uma idade média de 15,4 dias de vida (mín. 2; máx. 59). Em T1, para os 81 vitelos amostrados, a idade média foi de 48,6 dias de vida (mín. 29; máx. 97), ligeiramente superior aos 45 dias desejados e em T2 os 60 vitelos apresentaram uma idade média de 72,1 dias de vida (mín. 48; máx. 102), ligeiramente abaixo dos 75 dias desejados. Apesar das médias estarem perto dos valores esperados, estas podem ser pouco exactas, podendo-se observar este facto no momento T0 onde se tem um valor mínimo de 2 e um valor máximo de 59 dias de vida mas a média mostra 15,4 dias de vida, valor pretendido pelo estudo. O intervalo entre cada uma das 3 recolhas deveria ser de 30 dias mas o que se verificou foi um intervalo com uma média de 32,3 dias entre a primeira e a segunda recolha e 24,2 dias entre a segunda e a terceira recolha (Anexo V). É necessário ter em conta que os animais incluídos na amostra ($n = 106$) não entraram todos na exploração no mesmo dia, mas sim em pequenos grupos ao longo dos meses de Fevereiro e Março.

No total recolheram-se duzentas e quarenta e sete amostras de fezes de vitelo entre os meses de Janeiro e Maio por meio de zaragatoa com meio de conservação. Cada zaragatoa foi identificada com um código ao qual corresponde o número do Sistema de Identificação Animal (S.I.A) do animal.

As zaragatoas foram transportadas para o Laboratório de Resistência a Antibióticos e Biocidas (LRA) da FMV e processadas no próprio dia ou no dia seguinte. Enquanto não foram processadas, as zaragatoas foram mantidas em bancada à temperatura ambiente.

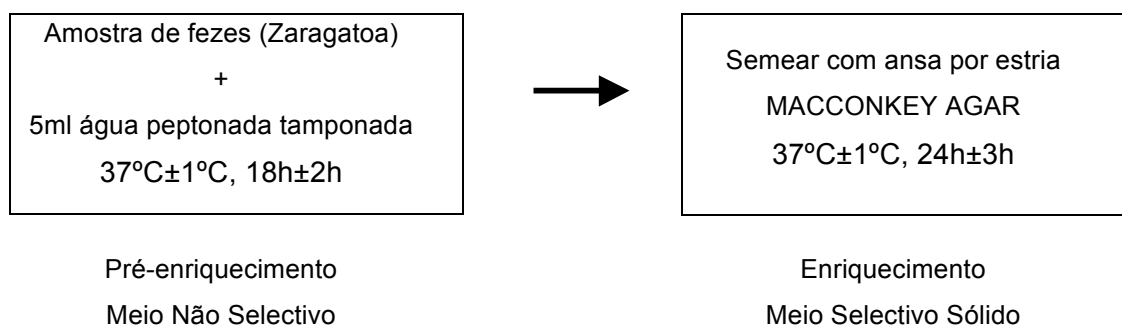
3. *Escherichia coli* comensal

3.1. Isolamento de *Escherichia coli* comensal

As amostras foram analisadas para a pesquisa de *E. coli* recorrendo a um esquema desenvolvido pelo LRA da FMV (Figura 6).

Figura 6. Protocolo laboratorial de isolamento de *E. coli* a partir de zaragatoas de fezes de vitelos

PROTOCOLO LABORATORIAL



Cada zaragatoa foi colocada em 5ml de água peptonada tamponada (BPW, Scharlau, Barcelona, Espanha), um meio líquido não selectivo, homogeneizada e incubada a 37°C±1°C durante 18h±2h. Após incubação, semeou-se cada amostra com uma ansa de 10µl por estria em placas de MacConkey Agar (Mck, Merck, Darmstadt, Alemanha). As placas foram submetidas a nova incubação a 37°C±1°C durante 24h±3h.

3.2. Identificação de isolados de *Escherichia coli* comensal

3.2.1. Extração de ADN

As amostras positivas a *E. coli* nas placas de MacConkey Agar (Mck, Merck, Darmstadt, Alemanha), avaliadas pela morfologia, cor e cheiro das colónias, foram repicadas para placas de Mueller-Hinton Agar (MH₂, Biomérieux) e incubadas a 37°C±1°C durante 24h±3h para posterior extração de ADN pelo método de fervura desenvolvido pela Professora Constança Pomba no âmbito da sua tese de Doutoramento. Num tubo eppendorf colocou-se 1000µl de água miliQ e uma fracção de colónias de cultura pura de *E. coli* e levou-se a centrifugar durante 8 minutos a 14000rpm. Decantou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o depósito em 500µl de água miliQ. Voltou-se a centrifugar a amostra durante 2 mins a 14000rpm. Decantou-se novamente o sobrenadante e repetiu-se o último passo. Após nova decantação, ressuspendeu-se o depósito em apenas 100µl de água miliQ e levou-se ao lume em Banho Maria durante 15 mins. Voltou-se a centrifugar durante 8 minutos a 14000rpm e recolheu-se o sobrenadante para um tubo eppendorf novo.

3.2.2. Identificação por PCR

Segundo McDaniels *et al* (1996) a enzima glutamato descarboxilase (GAD), codificada pelos genes *gadA* e *gadB*, é específica de *Escherichia coli* e, como tal, o desenvolvimento de um método de detecção da enzima como processo de identificação genotípica de isolados de *E. coli* aumenta a especificidade e a sensibilidade do teste (Rice *et al*, 1993). Os dois genes *gadA* e *gadB* são extremamente homólogos entre si e ocorrem sempre no genoma de *E. coli* por isso o ADN extraído foi submetido a “Polymerase Chain Reaction” (PCR) para amplificação específica do gene *gadA/B*. O processo utilizado foi estabelecido pelo Laboratório de Resistência aos Antibióticos e Biocidas da FMV adaptado de McDaniels *et al* (1996), tendo em conta os *primers* necessários e a *Taq* Polimerase utilizada (Tabela 3). Os primers utilizados, oligonucleotidos registados no GenBank sob o nº M84024 (*gadA*) e M84025 (*gadB*), são 100% homólogos ao gene *gadA/B* (McDaniels *et al*, 1996).

Figura 7. Sequência genómica do primer *gadA/B forward* e *reverse* utilizado para a realização do PCR para identificação dos isolados de *E. coli* segundo McDaniels *et al* (1996)

forward 5' – ACCTGCGTTGCGTAAATA – 3'

reverse 5' – GGGCGGGAGAAGTTGATG – 3'

Tabela 3. Esquema do programa realizado pelo termociclador para o PCR *gadA/B* utilizado pelo LRA, adaptado de McDaniels *et al*, 1996

		Temperatura (°C)	Tempo (min)
Desnaturação inicial		94	2
Desnaturação	30 ciclos	94	0,5
Hibridação		54	0,5
Extensão		72	1
Extensão final		72	10

Os primers representam pequenas sequências da cadeia complementar do gene *gadA/B* que se deseja replicar. A *Taq* polimerase é uma ADN polimerase termoestável que permite criar enzimaticamente a nova cadeia de ADN utilizando os nucleótidos fornecidos pelo dNTP Mix (mistura de desoxirribonucleotídeos trifosfato). A adição de íon magnésio (Mg^{2+}) permite diminuir o erro durante a síntese das novas cadeias de ADN e o tampão permite manter as condições ideais para a realização do programa. Para cada isolado de *E. coli* fez-se uma mistura de 1µl de ADN, 0,1µl de *Taq* polimerase (Fermentas International Inc, Ontário, Canadá), 0,4µl de cada um dos *primers* (*forward* e *reverse*), 0,2µl de dNTPs, 3µl de $MgCl_2$, 2,5µl de tampão 10x e 17,4µl de água miliQ, perfazendo um total de 25µl.

De seguida, as cadeias amplificadas foram submetidas a uma electroforese em gel de agarose a 1,5%, colocando em cada poço aproximadamente 10µl de cada produto de PCR com 5µl de xilenocianol 2,5mg/ml + glicerol a 30%, actuando como corante e estabilizador dos produtos de amplificação durante a corrida. O marcador de peso molecular de ADN utilizado foi o GeneRuler 100bp DNA Ladder (Fermentas International Inc, Ontário, Canadá) na concentração de 0,5µg/µl. A cada gel de 300ml foi adicionado 10 µl de Brometo de Etídeo 10mg/ml (Invitrogen, CA, EUA) para actuar como revelador. Os produtos do PCR foram observados por comparação com os pesos moleculares de ADN do marcador, sendo que o gene *gadA/B* possui 600 pares de bases (McDaniels, *et al*, 1996).

Se o PCR de uma amostra desse negativo após repetição, esta era testada por uma prova bioquímica: API 20E (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) para identificação da bactéria em questão.

3.3. Susceptibilidade aos Antibióticos

Para testar a susceptibilidade dos isolados positivos de *E. coli* aos antibióticos recorreu-se ao método de difusão de discos com discos (Oxoid, Hampshire, United Kingdom) dos seguintes antibióticos: ampicilina (10µg), amoxicilina/ácido clavulânico (20/10µg), ceftiofur (30µg), enrofloxacin (5µg), tetraciclina (30µg) e trimetoprim/sulfametoxazole (1.25/23.7µg).

O teste foi feito em placas de Mueller-Hinton Agar (MH₂, Biomérieux), a partir de colônias de cultura pura de *E. coli*, incubadas a 37°C±1°C durante 18-20h.

Os resultados foram interpretados de acordo com os critérios M31-A3 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008).

Tabela 4. Método de difusão de discos: Antibióticos utilizados e critérios de avaliação segundo o *Clinical Laboratory Standards Institute*, 2008.

Classe de Antibióticos	Antibiótico	Abreviatura	Disco (µg)	Diâmetro (mm)		
				S	I	R
β-lactâmicos	Penicilinas	Ampicilina	Amp	10	≥17	14-16 ≤13
	Penicilinas associadas	Amoxicilina/ Ácido Clavulânico	Amc	20/10	≥18	14-17 ≤13
	Cefalosporinas	Ceftiofur ^a	Xnl	30	≥21	18-20 ≤17
	Fluoroquinolonas	Enrofloxacina	Enr	5	≥21	17-20 ≤16
	Tetracilinas	Tetraciclina	Te	30	≥19	15-18 ≤14
	Sulfonamidas Potenciadas	Trimetoprim-Sulfametoxazol	Sxt	1.25/23.7	≥16	11-15 ≤10

^a Critério para Doença Respiratória Bovina (DRB) – *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* e *Histophilus somni*; e Mastite Bovina – *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis* e *Escherichia coli*

Na sequência dos testes de sensibilidade a antibióticos (TSA) os resultados foram analisados de acordo com os padrões de resistência apresentados. Um isolado resistente apenas a uma classe de antibióticos apresenta resistência simples, resistente a duas classes diferentes diz-se que apresenta resistência múltipla e resistentes a três ou mais classes diz-se multirresistente. Um isolado sem resistências é um isolado susceptível.

3.4. *Escherichia coli* produtoras de ESBL's

Os isolados de *E. coli* produtores de ESBL's têm a particularidade de se apresentarem resistentes às cefalosporinas, uma vez que produzem uma enzima que hidroliza o anel β-lactâmico. Porém quando lhes é adicionado um inibidor das beta-lactamases como o ácido clavulânico essa resistência desaparece (Enzimas de classe A segundo a classificação de Ambler, inibidas *in vitro* pelo ácido clavulânico) (Ambler, 1980). Neste caso o halo de inibição, que não é visível no disco do ceftiofur uma vez que o isolado é resistente ao antimicrobiano, surge na região onde há contacto entre o ceftiofur e a amoxicilina/ácido clavulânico, demonstrando a sinergia entre o ceftiofur e o ácido clavulânico.

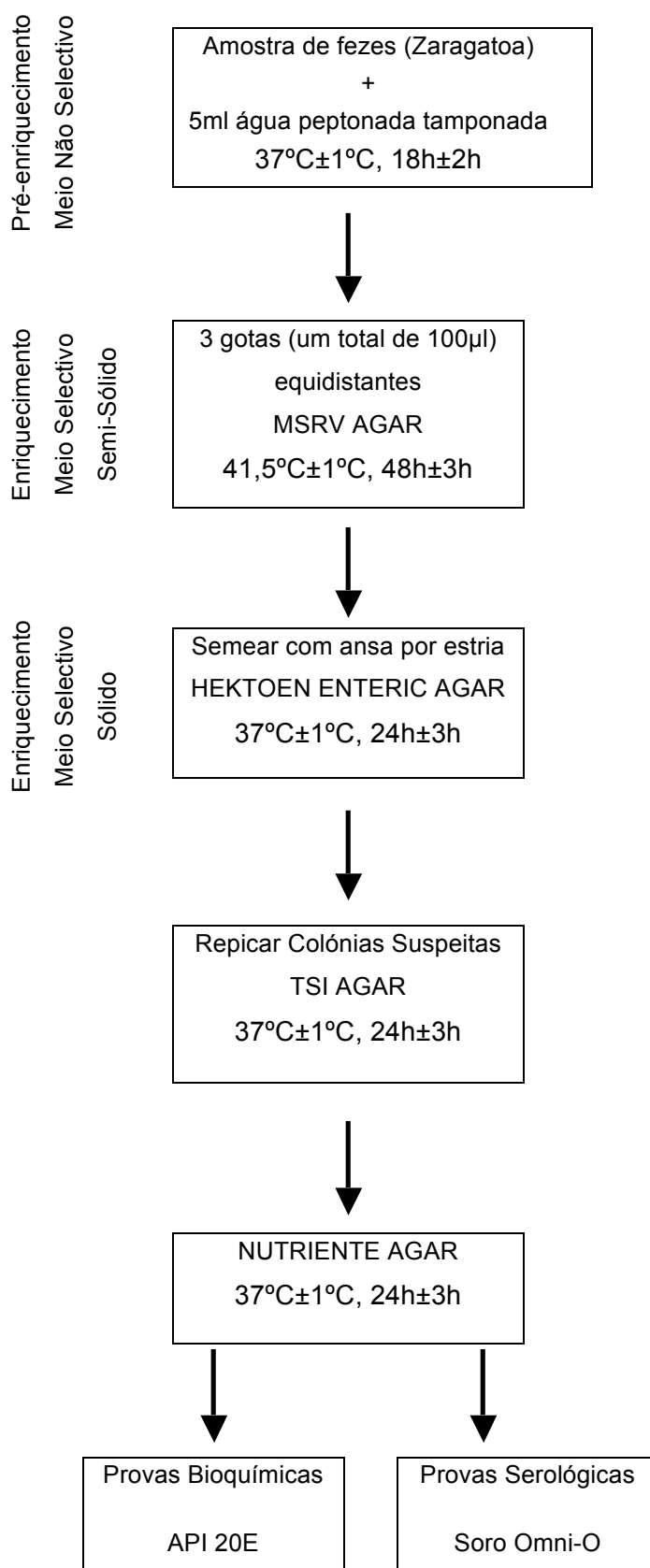
Através da realização dos testes de susceptibilidade a antibióticos foi possível determinar a presença de sinergias pelo método de duplo disco, ao observar a interacção entre os halos de inibição dos discos de ceftiofur e de amoxicilina/ácido clavulânico.

4. *Salmonella* spp.

4.1. Isolamento de *Salmonella* spp.

Para o isolamento e identificação de *Salmonella* spp. recorreu-se à adaptação da técnica recomendada pela “International Organization for Standardization” (ISO) 6579:2002 – “Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.”, Anexo D: “Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage” (Figura 8).

Figura 8. Protocolo Laboratorial para o isolamento e identificação de *Salmonella* spp. a partir de amostras de fezes de vitelos adaptado da ISO 6579:2002, anexo D.



Como executado para o isolamento de *Escherichia coli*, as amostras de fezes (zaragatoas) foram colocadas em 5ml de água peptonada tamponada, homogeneizadas e incubadas durante 18h±2h a 37°C±1°C. Após incubação, semeou-se em placas de “Modified Semi-Solid Rappaport Vassiliadis” (MSRV, Biokar, Beauvais, França), um meio de enriquecimento semi-sólido, 3 gotas da suspensão equidistantes entre si de modo a prefazer um volume total de 100µl e colocou-se em estufa a 41,5°C±1°C durante 48h±3h. Ao fim das 48h colheu-se uma fracção de cultura com uma ansa de 1µl das placas positivas e semeou-se por estria em placas de meio selectivo sólido “Hektoen Enteric Agar” (HE, Scharlau, Barcelona, Espanha). A incubação deu-se aos 37°C±1°C durante 24h±3h. Colónias verdes com ou sem centro preto são características de *Salmonella* spp. correspondendo a um isolamento positivo.

Tabela 5. Características de colónias de *Salmonella* spp. e outras bactérias em meio de “Hektoen Enteric Agar” (Scharlau, Barcelona, Espanha), adaptado de Domingos, 2010.

Bactérias	Meio “Hektoen Enteric Agar”
<i>Salmonella</i> spp.	Colónias verdes com ou sem centro preto
<i>Salmonella choleraesuis</i>	Colónias verdes azuladas com centro preto
<i>Escherichia coli</i>	Colónias laranjas, amarelas ou salmão
<i>Shigella flexneri</i>	Colónias verdes azuladas
<i>Pseudomonas</i>	Colónias irregulares, planas, verdes ou castanhas

4.2. Identificação de *Salmonella* spp.

As colónias suspeitas foram repicadas para meio de “Triple Sugar Iron” Agar (TSI, Scharlau, Barcelona, Espanha) com gelose inclinada e incubadas durante 24h±3h a 37°C±1°C para identificar as colónias de *Salmonella* spp. A tabela 6 demonstra as características de diferentes bactérias em TSI Agar após 24h de incubação.

Tabela 6. Parâmetros para a identificação de diferentes bactérias em meio de TSI Agar, adaptado de Domingos, 2010

	Gelose Inclinada	Fundo	Produção de H ₂ S
<i>Salmonella typhimurium</i>	Vermelha	Amar; com gás	+
<i>S. cholerasuis</i>	Vermelha	Amar; com gás	-
<i>S. enteritidis</i>	Vermelha	Amar; com gás	+
<i>S. gallinarum</i>	Vermelha	Amar; sem gás	+
<i>S. pullorum</i>	Vermelha	Amar; com gás	+
<i>S. typhi</i>	Vermelha	Amar; sem gás	+
<i>S. paratyphi A</i>	Vermelha	Amar; com gás	-
<i>S. paratyphi B</i>	Vermelha	Amar; com gás	+
<i>Shigella dysenteriae</i>	Vermelha	Amar; sem gás	-
<i>S. flexneri</i>	Vermelha	Amar; sem gás	-
<i>S. sonnei</i>	Vermelha	Amar; sem gás	-
<i>S. boydii</i>	Vermelha	Amar; sem gás	-
<i>Proteus vulgaris</i>	Amarela	Amar; com gás	+
<i>P. mirabilis</i>	Vermelha	Amar; com gás	+
<i>P. morgani</i>	Vermelha	Amar; com gás	-
<i>P. rettgeri</i>	Vermelha	Amar; sem gás	-
<i>Serratia marcescens</i>	Vermelha	Amar; sem gás	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Amarela	Amar; com gás	-
<i>E. hafniae</i>	Vermelha	Amar; com gás	-
<i>E. cloacae</i>	Amarela	Amar; com gás	-
<i>Escherichia coli</i>	Amarela	Amar; com gás	-
<i>Citrobacter freundii</i>	Amarela	Amar; com gás	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Amarela	V/A; com gás	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Vermelha	Verm; sem gás	-
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Vermelha	Verm; sem gás	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Vermelha	Verm; sem gás	-

Verm – vermelho; Amar – amarelo; V/A – vermelho ou amarelo

4.3. Serotipificação de *Salmonella* spp.

Após identificação positiva das colônias de *Salmonella* spp. em TSI Agar, estas foram repicadas para placas de Nutriente Agar (Biokar, Beauvais, França) e incubadas a 37°C±1°C durante 24h±3h.

A serotipificação das colônias suspeitas foi feita com base no Esquema de Kauffmann-White (Hendriksen & Larsen, 2004; Guibourdenche et al., 2009; Grimont & Weill, 2007; Bale et al., 2007), segundo o método de aglutinação com antisoros comerciais (Biorad, Madrid,

Espanha). O teste baseia-se na ocorrência de uma reacção de aglutinação entre a bactéria suspeita e o antisoro segundo o princípio de que os anticorpos presentes no soro aglutinam com a bactéria quando os antígenos correspondentes estão presentes, demonstrando-se pelo aparecimento de grumos (reacção positiva) em vez da suspensão leitosa inicial (reacção negativa).

Uma gota do soro polivalente Omni-O foi colocada sobre uma lâmina de vidro ao qual se juntou, com uma ansa de 10µl, um pouco de cultura pura da amostra suspeita. Homogeneizou-se até obter uma suspensão leitosa e, após agitar levemente a lâmina durante uns segundos, esta foi observada com iluminação indirecta para determinar a presença ou ausência de grumos. No caso do aparecimento de grumos, a reacção foi considerada positiva e continuou-se o esquema, testando os restantes soros polivalentes O (OMA e OMB). Seguindo as reacções positivas, testou-se os soros monovalentes O para determinar o grupo somático a que pertence a estirpe a testar.

Uma vez determinado o grupo somático, continuou-se o procedimento de modo a identificar os antígenos flagelares (H) da colónia suspeita de *Salmonella* spp. Para se testar quais os antígenos flagelares presentes, as colónias foram homogeneizadas com antisoros polivalentes H até se obter uma reacção positiva. Novamente seguindo o esquema de Kauffmann-White, passou-se à utilização de soros monovalentes H. É de notar que a aglutinação com os antisoros H é mais flocular quando comparada com a aglutinação com os antisoros O.

A maioria dos serovares de *Salmonella* apresenta 2 fases flagelares (ex: *S. Typhimurium*) (Duarte, 1999) e com a reacção positiva a um antisoro monovalente H determinou-se a primeira fase flagelar. Para determinar a especificidade da segunda fase flagelar seria necessário utilizar o método de “Sven Gard” em placa.

Neste trabalho apenas se serotipificou os isolados de *Salmonella* spp. no Laboratório de Resistência a Antibióticos e Biocidas até ao grupo somático, uma vez que não foi possível seguir a serotipificação até ao fim. As estirpes de *Salmonella* spp. foram, então, enviadas para concluir a serotipificação para o Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA), Laboratório de Referência para *Salmonella* em Portugal.

4.4. Susceptibilidade aos Antibióticos

A susceptibilidade aos antibióticos dos isolados positivos de *Salmonella* spp. foi testada pelo método de difusão de discos, tal como efectuado nos isolados de *E. coli*, com discos (Oxoid, Hampshire, United Kingdom) dos seguintes antibióticos: ampicilina (10µg), amoxicilina/ácido clavulânico (20/10µg), ceftiofur (30µg), enrofloxacin (5µg), tetraciclina (30µg) e trimetoprim/sulfametoxazole (1.25/23.7µg). O teste foi feito em placas de Müller-Hinton

Agar (MH₂, Biomérieux), a partir de colónias de cultura pura de *Salmonella* spp. incubadas a 37°C±1°C durante 18-20h.

Os resultados foram interpretados segundo os critérios M31-A3 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008), descritos na tabela 4, e analisados de acordo com os padrões de resistência apresentados. Um isolado sem resistências é um isolado susceptível, um isolado resistente apenas a uma classe de antibióticos apresenta resistência simples, um isolado resistente a duas classes diferentes diz-se que apresenta resistência múltipla e resistentes a três ou mais classes diz-se multirresistente.

5. Análise Estatística

Para a avaliação da associação entre a exposição às fluoroquinolonas e o aparecimento de resistência a diferentes antimicrobianos utilizou-se um modelo de regressão logística no qual se considerou como variável dependente a existência ou não de resistência e como variável independente o tempo de colheita. Para a avaliação da associação entre a exposição às fluoroquinolonas e o aparecimento de multirresistência e também de resistência à enrofloxacin foi utilizado um modelo de regressão logística exacta, uma vez que em ambos os casos não se observou nenhum isolado sensível em T1. Para estas análises foi utilizado o software SAS v.92 (SAS Institute, Cary, NC, EUA).

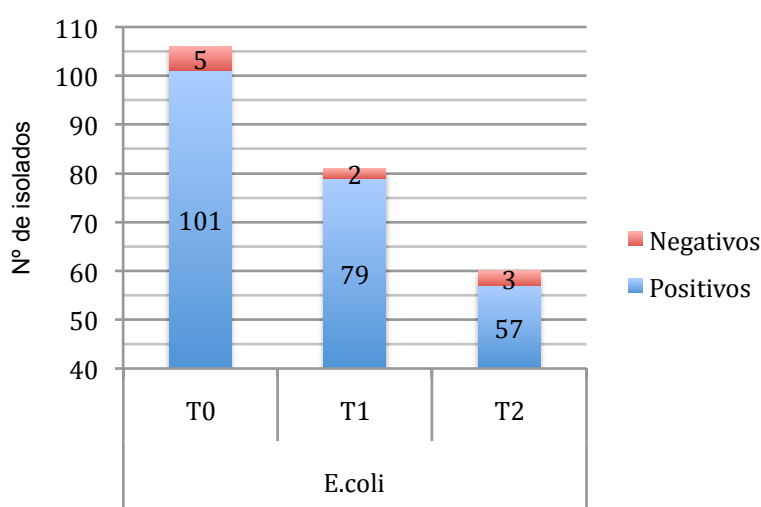
Procedeu-se também a uma análise descritiva das prevalências de isolados de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. com intervalo de confiança de 95%, assim como a análise das idades dos indivíduos da amostra no momento de amostragem e o intervalo em dias entre recolhas, recorrendo a médias, máximos e mínimos.

1. *Escherichia coli*

1.1. Isolamento e Identificação de isolados de *Escherichia coli*.

Das 247 amostras de fezes recolhidas, cento e seis são referentes ao T0, oitenta e uma referentes a T1 e sessenta a T2. Do total de amostras recolhidas, 237 foram positivas a *E. coli*.

Figura 9. Ocorrência de *Escherichia coli* nos três momentos de recolha T0, T1 e T2



Em T0, das 106 amostras recolhidas 101 foram positivas a *E. coli*. Em T1 setenta e nove das 81 amostras foram positivas e em T2 das 60 amostras apenas 3 foram dadas como negativas a *E. coli* (Figura 9).

Para o cálculo da prevalência de *E. coli* nos diferentes tempos de análise utilizou-se um intervalo de confiança de 95%. Assim, para T0 a prevalência foi de 95,3% (I.C._{95%}: 89,3 – 98,3%), para T1 foi de 97,5% (I.C._{95%}: 91,4 – 99,7%) e para T2 foi de 95,0% (I.C._{95%}: 86,1 – 99,0%).

Do total de amostras negativas, 6 foram negativas em meio de MacConkey Agar (Mck, Merck, Darmstadt, Alemanha) uma vez que não cresceram colónias cor de rosa, típico de bactérias Gram negativas fermentadoras da lactose e 4 deram negativas após a corrida do PCR (Figura 10). Estas últimas foram testadas em API 20E (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) para identificação da bactéria presente (Tabela 7).

Figura 10. Gel de Electroforese de produtos de amplificação do gene *gadA* por PCR de estirpes de *Escherichia coli*. M, DNA Ladder; 1, Controlo Negativo; 2, 3 e 4, Produtos de PCR amplificadas com primers do gene *gadA/B*; 5, Controlo Positivo.

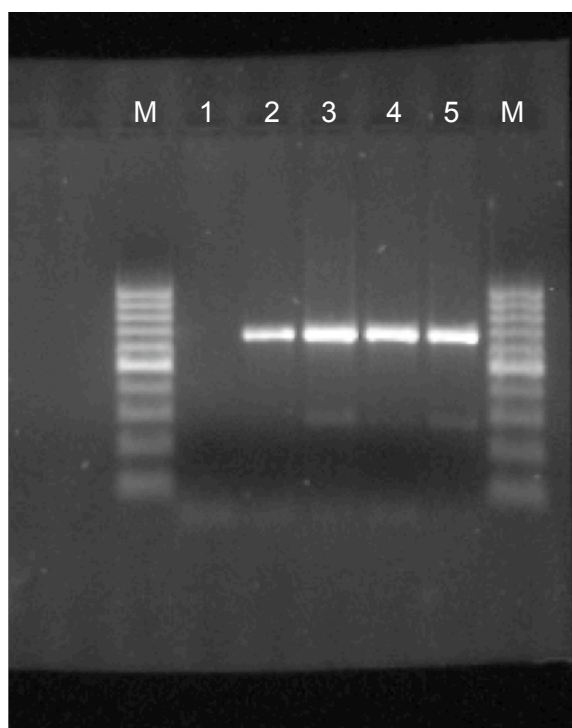


Tabela 7. Amostras de fezes com resultado negativo a *E. coli* em MacConkey Agar ou após PCR com posterior API 20E para identificação do isolado.

Amostra	MacConkey Agar	PCR	API 20E
VF13T0	+	-	Citrobacter freundii (99.8%)
VF15T0	+	-	Citrobacter braakii (93.3%)
VF25T0	-	N/A	N/A
VF80T0	-	N/A	N/A
VF98T0	+	-	Klebsiella pneumoniae pneumoniae (97.7%)
VF55T1	+	-	Klebsiella ornitinolytica (99.9%)
VF59T1	-	N/A	N/A
VF17T2	-	N/A	N/A
VF34T2	-	N/A	N/A
VF81T2	-	N/A	N/A

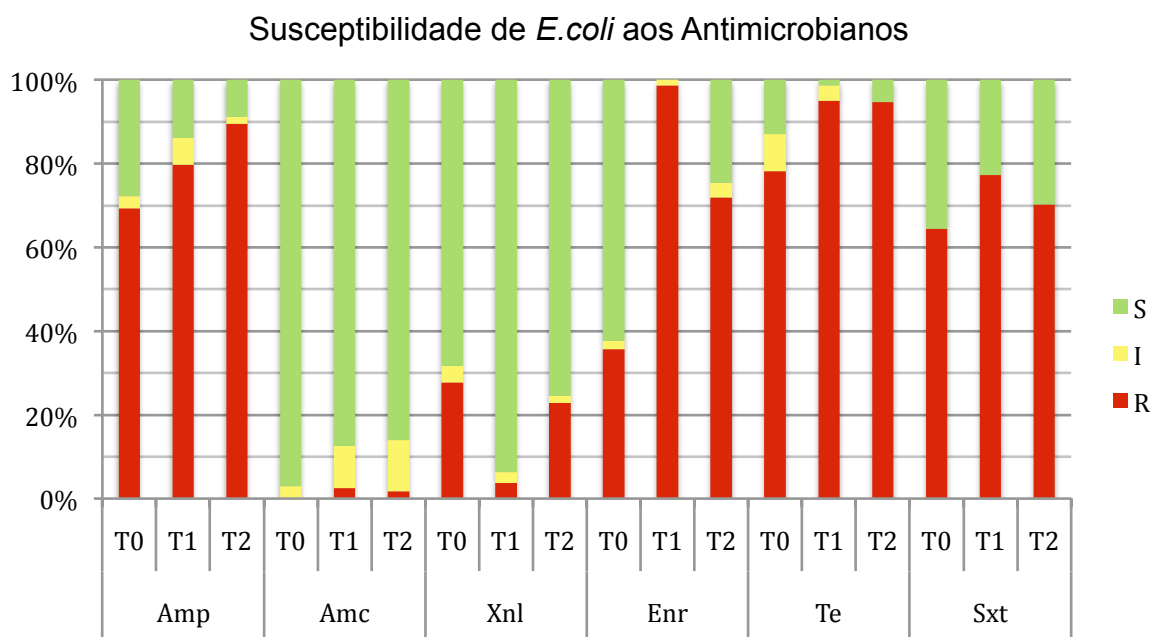
N/A – Não aplicável

1.2. Susceptibilidade aos Antibióticos

A todas as amostras positivas a *E. coli*. foi realizado um teste de susceptibilidade a antibióticos cujos resultados foram interpretados de acordo com os critérios M31-A3 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008) (Anexos VI, VII e VIII).

As percentagens dos isolados de *E. coli* resistentes aos diferentes antimicrobianos em T0, T1 e T2 foram as seguintes: ampicilina – 69,2%, 79,8% e 89,7%; amoxicilina/ácido clavulânico – 0,0%, 2,5% e 1,7%; ceftiofur – 27,9%, 3,8% e 22,4%; enrofloxacina – 35,6%, 98,7% e 72,4%; tetraciclina – 78,9%, 94,9% e 94,8% e trimetoprim/sulfametoxazole – 64,4%, 77,2% e 70,7%, tal como mostra a figura 11.

Figura 11. Susceptibilidade dos isolados de *Escherichia coli* aos diferentes antimicrobianos obtidos a partir de fezes de vitelos entre Fevereiro e Maio de 2010 nos tempos de recolha T0, T1 e T2, classificados em sensível (S), intermédio (I) ou resistente (R) após TSA.



Amp - Ampicilina; Amc - Amoxicilina/ácido clavulânico; Xnl – Ceftiofur; Enr – Enrofloxacina; Te – Tetraciclina; Sxt – Trimetoprim/sulfametoxazole; S – Sensível; I – Intermédio; R – Resistente;

Através da figura 11 pode-se analisar a evolução do aparecimento de resistências ao longo do estudo para os diferentes antibióticos estudados. Para a ampicilina observa-se um aumento contínuo na percentagem de isolados resistentes, com consequente diminuição de isolados sensíveis. A amoxicilina/ácido clavulânico apresenta um aumento de resistências de T0 para T1 mas uma ligeira diminuição de T1 para T2, porém a percentagem de sensíveis mantém-se dominante ao longo dos 3 momentos. Quanto ao ceftiofur, a resistência dos isolados diminui de T0 para T1 mas sofre um aumento em T2 para valores perto dos valores de T0. A resistência dos isolados de *E. coli* à enrofloxacina aumenta

exponencialmente do primeiro momento para o segundo mas diminui ligeiramente em T2. Quanto à tetraciclina, a resistência dos isolados aumenta para quase 100% e mantém-se estável em T2. Por fim, a resistência ao trimetoprim/sulfametoxazole aumenta de T0 para T1 e sofre um ligeiro decréscimo em T2.

Tabela 8. Resultados do modelo de regressão logística para a associação entre a exposição às fluoroquinolonas e a resistência a diferentes antimicrobianos em 237 isolados de *Escherichia coli* entre Fevereiro e Maio de 2010

		Ampicilina		Ceftiofur		Tetraciclina	
		Parâmetro estimado	Valor de p	Parâmetro estimado	Valor de p	Parâmetro estimado	Valor de p
Intercepção		2.34		-1.2		2.91	
Variável	T		<0.001		<0.001		<0.01
Tempo de Colheita	T0	-1.4 ^a		0.32 ^a		-1.07 ^a	
	T1	-0.6 ^b		-1.99 ^b		1.41 ^b	
	T2	0.00 ^b		0.00 ^a		0.00 ^{ab}	

Letras supraescritas diferentes representam diferenças significativas entre os diferentes tempos de colheita para o mesmo antimicrobiano.

Tabela 9. Resultado do modelo de regressão logística exacta para a associação entre a exposição às fluoroquinolonas e a resistência à enrofloxacin em 237 isolados de *Escherichia coli* entre Fevereiro e Maio de 2010

		Enrofloxacin	
		Parâmetro estimado	Valor de p
Variável	T		<0.001
Tempo de colheita	T0	-1.64 ^a	
	T1	3.57 ^b	
	T2	0.00 ^c	

Letras supraescritas diferentes representam diferenças significativas entre os diferentes tempos e colheita.

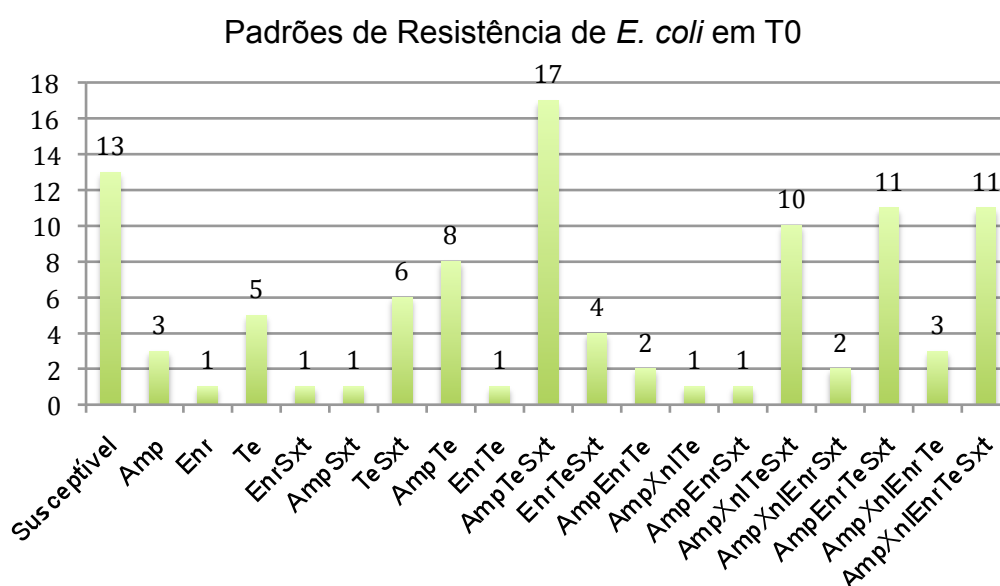
Segundo os dados expostos nas tabelas 8 e 9, existe um efeito significativo do tempo de exposição dos vitelos às fluoroquinolonas no aparecimento de isolados de *E. coli* resistentes à ampicilina, ao ceftiofur e à enrofloxacin (p < 0,001) e à tetraciclina (p < 0,01).

Quanto à ampicilina observou-se que a probabilidade de resistência é significativamente diferente em T0 mas não há diferenças entre T1 e T2. No caso do ceftiofur, a probabilidade de resistência é significativamente diferente em T1 mas não há diferenças entre T0 e T2. Quanto à enrofloxacin a probabilidade de resistência é significativamente diferente em todos os momentos de exposição. Por fim, analisando a tetraciclina, determinou-se que a probabilidade de resistência é significativamente diferente entre T0 e T1 mas não há diferenças entre T1 e T2 nem entre T0 e T2.

No caso da amoxicilina/ácido clavulânico (p = 0,15) e do trimetoprim/sulfametoxazole (p = 0,17) não são expostos dados nas tabelas uma vez que não há associação entre a exposição às fluoroquinolonas e o aparecimento de resistência aos dois antimicrobianos em questão (p > 0,05).

A probabilidade de resistência de isolados de *E. coli* à ampicilina aumenta significativamente entre T0 e T1 e aumenta novamente em T2. No caso do ceftiofur, a probabilidade de resistência diminui significativamente em T1 e aumenta significativamente entre T1 e T2. Em relação à enrofloxacin e à tetraciclina a probabilidade de resistência aumenta significativamente entre T0 e T1 mas diminui em T2, onde, no caso da enrofloxacin, esta diminuição é significativa.

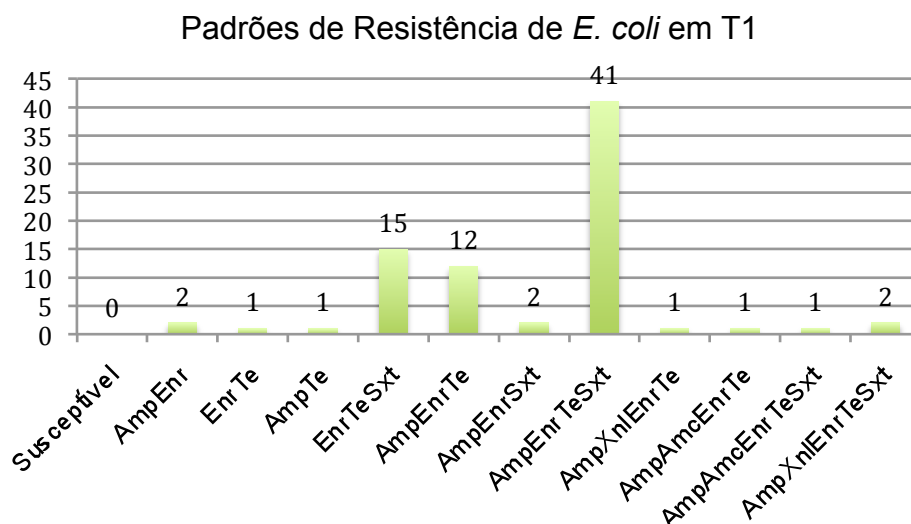
Figura 12. Padrões de Resistência observados nos isolados de *E. coli* obtidos em T0



Através do gráfico da figura 12 pode-se analisar os padrões de resistência verificados em T0. Treze dos 101 isolados eram sensíveis a todos os antimicrobianos (12,87%), 9 isolados

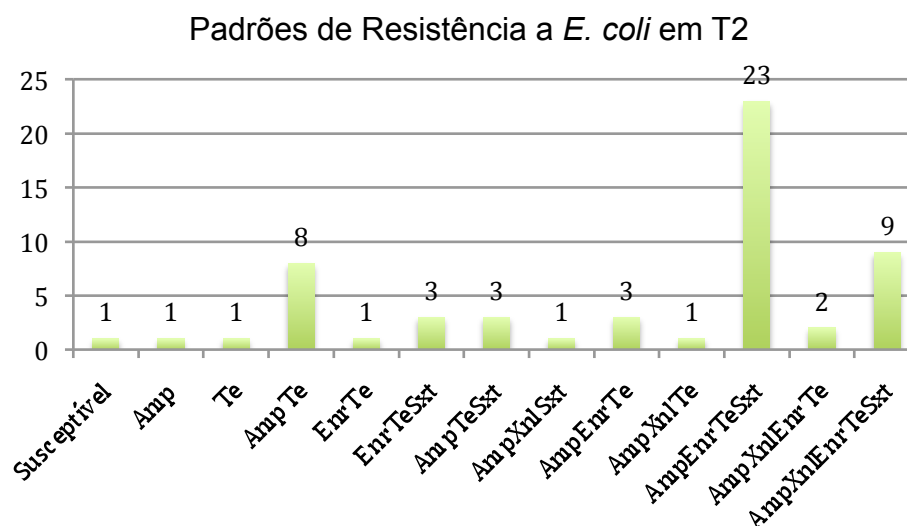
apresentaram-se com resistência simples (8,91%), 17 com resistência múltipla (16,83%) e 62 multirresistentes (61,38%).

Figura 13. Padrões de Resistência observados nos isolados de *E. coli* obtidos em T1



Na figura 13 observa-se que não houve isolados sensíveis nem isolados com resistências simples, 4 isolados apresentaram-se com resistência múltipla (5,06%) e 75 com multirresistência (94,93%) no momento T1.

Figura 14. Padrões de Resistência observados nos isolados de *E. coli* obtidos em T2



No momento T2, um isolado surgiu sensível (1,75%), 2 apresentaram resistência simples (3,50%), 9 apresentaram resistência múltipla (15,78%) e 46 foram multirresistentes (80,70%).

É de interesse para o estudo avaliar estatisticamente o significado dos valores de multirresistência nos três momentos de recolha de amostras (Tabela 10).

Tabela 10. Resultados do modelo de regressão logística exacta para a associação entre a exposição às fluoroquinolonas e o aparecimento de multirresistência em 237 isolados de *Escherichia coli* entre Fevereiro e Maio de 2010

		Parâmetro estimado	Valor de p
Variável	T		<0.001
Tempo de colheita	T0	-1.64 ^a	
	T1	1.69 ^b	
	T2	0.00 ^b	

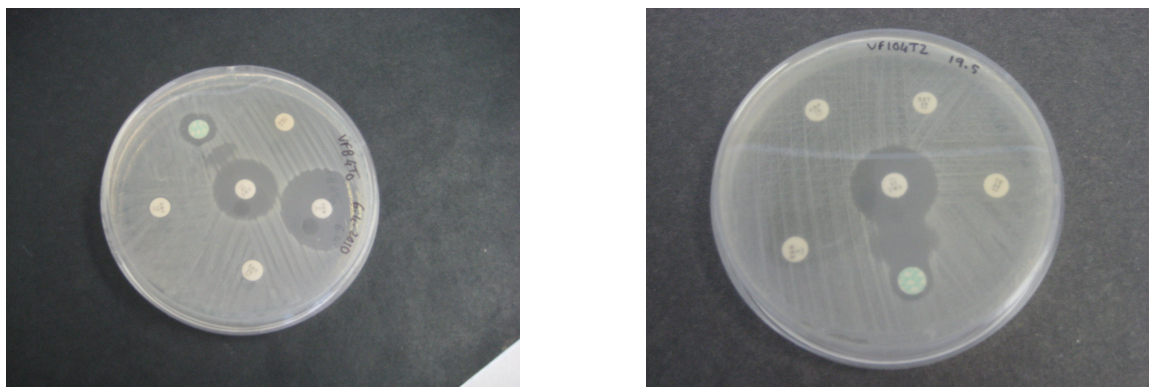
Letras supraescritas diferentes representam diferenças significativas entre os diferentes tempos de colheita

Verifica-se que existe um efeito significativo da variável tempo de colheita às fluoroquinolonas na probabilidade de existir isolados multirresistentes ($p < 0,001$). Também se observa que a probabilidade de multirresistência aumenta significativamente entre T0 e T1 mas entre T1 e T2 verifica-se uma diminuição de probabilidade sem diferença significativa.

1.3. *Escherichia coli* produtoras de ESBL's

A identificação de estirpes de *E. coli* produtoras de ESBL's foi feita através do método de duplo disco.

Figura 15. Observação de sinergias pelo método de duplo disco, entre os discos de Ceftiofur e Amoxicilina/Ácido Clavulânico em placas de TSA de isolados de *E. coli*



Após a realização dos TSA, obteve-se uma contagem de 23 sinergias positivas em T0, nenhuma sinergia em T1 e 12 sinergias em T2.

Tabela 11. Tabela Comparativa entre o aparecimento de sinergias e a ocorrência de resistência ao ceftiofur na placa de TSA nos isolados de *Escherichia coli*.

	T0	T1	T2
Nº Total de Resistências ao Ceftiofur	28	3	13
Nº Total de Sinergias	23	0	12
Resistente + Sinergia	19	0	11

Ao analisar a tabela 11 é possível verificar que em T0, dos 23 isolados com sinergia, 19 evidenciaram ser resistentes ao ceftiofur e em T2 dos 12 isolados com sinergia, 11 demonstraram-se resistentes. Apenas 4 isolados em T0 e 1 isolado em T2 apresentaram sinergia sem serem resistentes ao ceftiofur. Do mesmo modo, 9 dos 28 isolados em T0 demonstraram ser resistentes ao ceftiofur sem desenvolver sinergia tal como 2 dos 13 isolados em T2.

2. *Salmonella* spp.

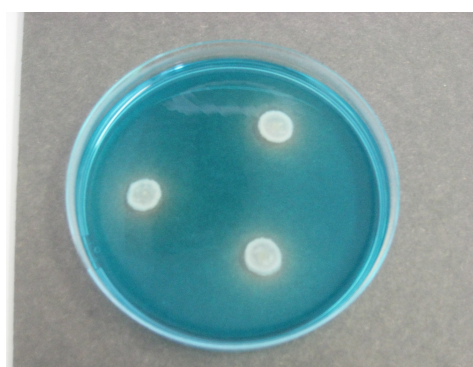
2.1. Isolamento e Identificação de *Salmonella* spp.

Ao contrário do que se verificou para a *Escherichia coli*, no caso da *Salmonella* spp. apenas se isolaram 12 colónias suspeitas em meio de MSRV (Biokar, Beauvais, França) no total de 247 amostras de fezes de vitelos saudáveis.

Figura 16. Isolamento de *Salmonella* spp. em placa de “Modified Semi-Solid Rappaport Vassiliadis”



Placa MSRV – *Salmonella* spp. +



Placa MSRV – *Salmonella* spp. -

Estas 12 colónias suspeitas foram repicadas para TSI para serem identificadas. Ao fim das 24h, os tubos de TSI apresentaram a rampa de gelose vermelha e o fundo amarelo. Alguns isolados também apresentaram produção de gás no fundo e outros produção de ácido sulfídrico. De acordo com a tabela 12, em T0 isolaram-se 5 estirpes de *Salmonella* spp. e em T2 isolaram-se 7. Dos 5 vitelos que acusaram positivo a *Salmonella* spp. na primeira colheita, 3 morreram antes da segunda recolha (T1) mas os restantes 2 vitelos foram acompanhados nos três momentos do estudo, sem voltarem a acusar a presença de *Salmonella* spp. entérica.

Tabela 12. Prevalência da *Salmonella* spp. em 247 amostras de fezes de vitelos recolhidas em três tempos distintos durante os meses de Fevereiro a Maio de 2010 numa exploração no Alentejo.

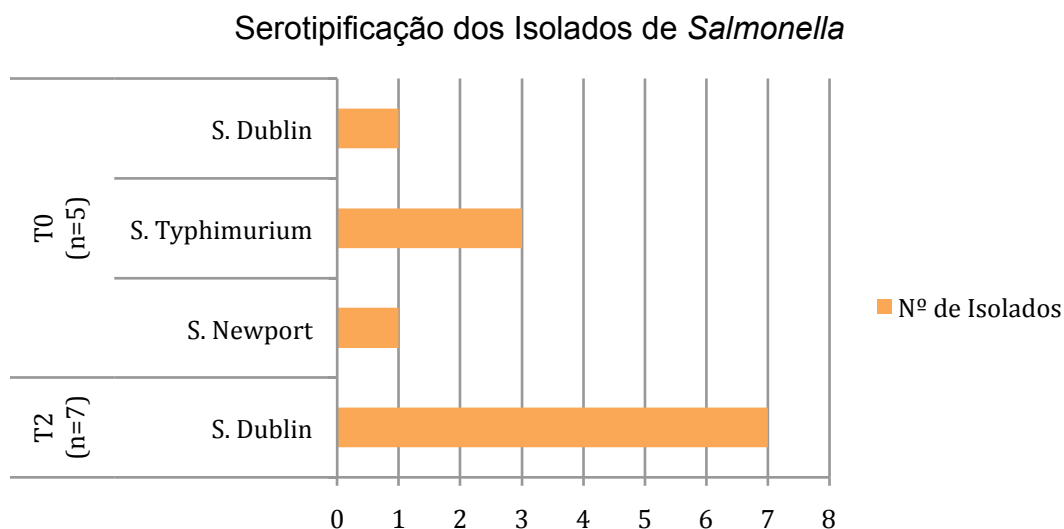
	T0	T1	T2
Amostra (n)	106	81	60
Positivos	5	0	7
Prevalência	4.7%	0%	11.7%
(IC. 95%)	(2.0 – 10.6%)	(0.0 – 4.5%)	(5.8 – 22.2%)

Segundo um intervalo de confiança de 95%, obteve-se uma prevalência de *Salmonella* spp. no momento de recolha T0 de 4,7% (IC_{95%}: 2,0 – 10,6%), no momento T1 de 0% (IC_{95%}: 0,0 – 4,5%) e no momento T2 de 11,7% (IC_{95%}: 5,8 – 22,2%). É necessário evidenciar o momento de recolha de amostras logo após a exposição à enrofloxacin (T1) onde a prevalência foi de 0%, o que implica que não houve isolados de salmonela.

2.2. Serotipificação de isolados de *Salmonella* spp.

Após a identificação das colónias de salmonela, procedeu-se à sua serotipificação de acordo com o Esquema Kaufman-White (Hendriksen & Larsen, 2004; Guibourdenche *et al*, 2009; Grimont & Weill, 2007; Bale *et al*, 2007). Para este efeito recorreu-se aos serviços do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, em Lisboa, de modo a completar a serotipificação das estirpes isoladas.

Figura 17. Serotipificação dos 12 isolados de *Salmonella* spp. obtidos a partir de fezes de vitelos saudáveis entre os meses de Fevereiro e Maio de 2010 através do método de aglutinação por antisoros da Biorad (Madrid, Espanha).

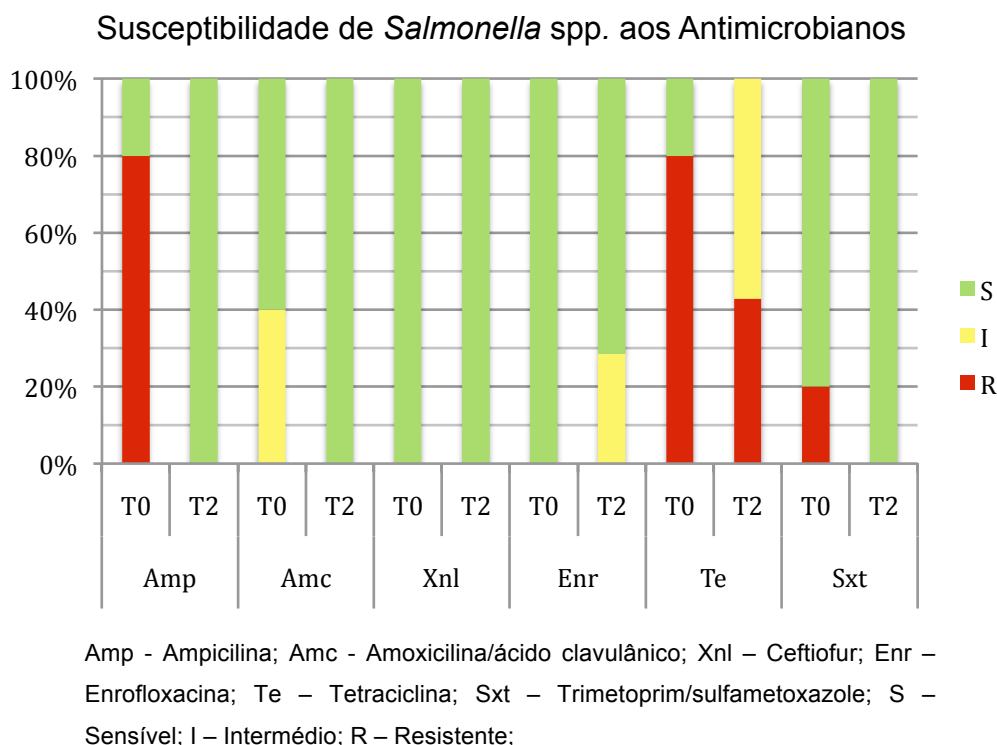


Das 12 estirpes isoladas identificaram-se 3 serótipos diferentes: em T0 isolou-se os serótipos *Salmonella enterica* subespécie *enterica* serovar Dublin, *Salmonella enterica* subespécie *enterica* serovar Typhimurium e *Salmonella enterica* subespécie *enterica* serovar Newport, sendo a S. Typhimurium a mais frequente (60%), seguindo-se pela S. Dublin e S. Newport ambas com 20%. Em T2 isolou-se apenas o serótipo *Salmonella enterica* subespécie *enterica* serovar Dublin (Figura 17).

2.3. Susceptibilidade aos Antibióticos

Todas as amostras positivas a *Salmonella* spp. foram submetidas a um teste de susceptibilidade a antibióticos (Anexo IX), a partir do qual se obteve as seguintes percentagens de resistência aos antimicrobianos testados nos momentos T0 e T2: ampicilina – 80% e 0%; amoxicilina/ácido clavulânico, ceftiofur e enrofloxacin - 0% em ambos os momentos; tetraciclina - 80% e 42,86% e trimetoprim/sulfametoxazole - 20% e 0%, tal como se demonstra na figura 18.

Figura 18. Susceptibilidade dos isolados de *Salmonella* spp. aos diferentes antimicrobianos obtidos a partir de fezes de vitelos entre Fevereiro e Maio de 2010 nos tempos de recolha T0 e T2, classificados em sensível (S), intermédio (I) ou resistente (R) após TSA.



Ao analisar a figura 18, observa-se a evolução das resistências ao longo do estudo para os diferentes antibióticos estudados. É importante denotar que não houve isolados de salmonela no momento de exposição às fluoroquinolonas, assim a análise da evolução depende apenas das recolhas antes da exposição e um mês após a mesma. Para a ampicilina observa-se uma diminuição acentuada da percentagem de isolados resistentes com consequente aumento dos isolados sensíveis. Quanto à amoxicilina/ácido clavulânico há um aumento de sensibilidade acompanhado por diminuição dos isolados intermédios. Em relação ao ceftiofur, a sensibilidade é de 100% nos dois momentos de análise. A resistência dos isolados de *Salmonella* spp. à enrofloxacina mantém-se nula em T2 mas observa-se um aumento na percentagem de isolados intermédios, associados a uma diminuição de sensibilidade. Quanto à tetraciclina, a percentagem de isolados sensíveis é nula em T2, aumentando os isolados intermédios e diminuindo os isolados resistentes. Por fim, a resistência ao trimetoprim/sulfametoxazole é semelhante à evolução da ampicilina, ou seja, a sensibilidade ao antimicrobiano aumenta de T0 para T2.

Tabela 13. Padrões de Resistência observados nos diferentes serótipos de *Salmonella* spp. isolados nos momentos T0 e T2 a partir de fezes de vitelos.

	Serovar	Padrão de Resistência	Nº de Isolados	Tipo de Resistência
T0 (n=5)	S. Newport	AmpTeSxt	1	Multirresistente
	S. Typhimurium	AmpTe	3	Resistência múltipla
	S. Dublin	Sensível	1	Sensível
T2 (n=7)	S. Dublin	Sensível	4	Sensível
		Te	3	Resistência simples

Amp - Ampicilina; Amc - Amoxicilina/ácido clavulânico; Enr – Enrofloxacin; Te – Tetraciclina; Sxt – Trimetoprim/sulfametoxazole;

Na Tabela 13 observa-se a associação entre os diferentes serótipos e o padrão de resistência expressado pelos diferentes isolados. A *S. Newport* expressou resistência à ampicilina, à tetraciclina e ao trimetoprim/sulfametoxazole e os 3 exemplares de *S. Typhimurium* eram todos resistentes à ampicilina e à tetraciclina. Quanto à *S. Dublin*, a estirpe isolada em T0 demonstrou-se sensível tal como 4 das 7 estirpes isoladas em T2. As restantes 3 *S. Dublin* eram resistentes apenas à tetraciclina. Quanto aos padrões de resistência, 5 das 12 estirpes eram sensíveis, o que representa 41,6% de sensibilidade, 3 estirpes demonstraram uma resistência simples (25%), 3 estirpes tinham uma resistência múltipla (35%) e apenas 1 estirpe tinha multirresistência (8,3%).

1. *Escherichia coli*

O estudo de *Escherichia coli* comensal é importante não pela sua prevalência nas explorações de Portugal mas sim porque é um organismo indicador dos níveis de resistência a antibióticos presente na flora intestinal das diferentes espécies animais. Assim, verificar que se obteve uma prevalência acima dos 95% em todos os momentos de análise do estudo não é factor de relevância, pois trata-se de uma bactéria comensal. Os resultados das análises aplicadas a esses mesmos isolados é que devem ser tidos em consideração, não só a susceptibilidade aos antibióticos como também o aparecimento de isolados produtores de ESBL's, pois a resistência que estes apresentam pode não ter uma importância directa mas a capacidade de transferência dessa mesma resistência a elementos zoonóticos é que pode ser problemático para a Saúde Pública (Sharma *et al*, 2008).

Com a realização dos testes de sensibilidade a antibióticos, conseguiu-se obter uma imagem geral sobre a resistência aos antimicrobianos antes, logo após e um mês depois da exposição intensiva a um antimicrobiano (Anexo VI, VII e VIII).

Segundo os resultados, a ampicilina foi o único antibiótico a demonstrar um aumento na probabilidade de resistências ao longo de todo o estudo. No entanto a tetraciclina demonstrou uma evolução semelhante, aumentando no momento de maior exposição mas mantendo-se relativamente constante um mês depois das exposições. A resistência à enrofloxacin evoluiu de forma esperada, aumentando exponencialmente no momento de exposição e diminuindo ligeiramente um mês depois da exposição. A evolução da resistência à amoxicilina/ácido clavulânico e ao trimetoprim/sulfametoxazole apresenta um ligeiro aumento de resistência no momento de exposição, seguido de uma diminuição em T2, mantendo-se, assim, relativamente constante ao longo do estudo. O ceftiofur, em contrapartida, apresentou uma evolução inversa pois no momento de maior exposição à enrofloxacin, a percentagem de resistências diminuiu e voltou a aumentar um mês depois do fim das administrações.

A evolução das resistências da maioria dos antimicrobianos segue uma linha esperada. Em T1 verifica-se um aumento significativo na pressão selectiva imposta sobre as bactérias devido à exposição à enrofloxacin, o que origina uma maior selecção de elementos com mutações. Esta acção traduz-se pelo aumento das resistências aos diferentes antimicrobianos testados. Em T2, a exposição ao factor de risco já não está presente e verifica-se uma diminuição na pressão selectiva imposta. Assim é de esperar uma diminuição relativa na percentagem de isolados resistentes aos antimicrobianos, uma vez que já não há uma pressão de selecção de mutações tão acentuada como em T1.

A exposição de bactérias a um antimicrobiano não implica que esse mesmo antimicrobiano tenha influência directa no desenvolvimento de resistências mas cria uma pressão selectiva muito forte que potencia o aparecimento de bactérias resistentes a diferentes antimicrobianos (Kaneene *et al*, 2008). Vários estudos já provaram que bactérias resistentes surgem, persistem e disseminam-se como resultado de uma pressão selectiva induzida pelo uso de antimicrobianos (DeFrancesco *et al*, 2004; Angulo *et al*, 2000). Outros estudos demonstram também que o desenvolvimento de resistências a antimicrobianos é um processo dinâmico que depende da pressão selectiva aplicada e cujas percentagens de resistência diminuem ao interromper a exposição ao antimicrobiano (Kaneene *et al*, 2008). Também Call e os seus colegas descrevem que em muitos casos, o uso de antimicrobianos origina um aumento transitório na prevalência de bactérias multiresistentes, que decresce quando se interrompe o seu uso (Call *et al*, 2008). À excepção do ceftiofur, todos os antimicrobianos perderam sensibilidade quando a pressão selectiva imposta pela exposição à enrofloxacin foi maior (momento T1) e recuperaram sensibilidade após a remoção do mesmo, estando de acordo com os diferentes estudos já mencionados. No entanto, a ampicilina não demonstrou uma diminuição de resistência após a remoção do factor de risco, mas sim um aumento de resistências. Num estudo de 2008, os autores fazem menção a dois estudos onde se provou que nem todas as interrupções na exposição a antimicrobianos levam à diminuição das resistências desenvolvidas nas bactérias (Sharma *et al*, 2008).

Contraditório ao que se acabou de descrever é a evolução das resistências ao ceftiofur. Era de esperar que, tal como os restantes antimicrobianos, o ceftiofur demonstrasse uma diminuição de sensibilidade no momento de maior exposição à enrofloxacin, porém verificou-se o oposto – um aumento de sensibilidade dos isolados no momento de maior exposição à enrofloxacin e um aumento das resistências em T2. Neste caso, põe-se a hipótese dos isolados de *E. coli* que se demonstraram resistentes ao ceftiofur em T0 serem simultaneamente sensíveis às fluoroquinolonas. Assim, ao serem expostas a doses elevadas de enrofloxacin, estas estirpes não se desenvolveram, aumentando a percentagem de isolados de *E. coli* sensíveis ao ceftiofur. Após a interrupção da exposição à enrofloxacin, essas mesmas estirpes já não se encontravam sobre uma pressão selectiva que as impedia de se desenvolver, voltando a aumentar a percentagem de elementos resistentes a esta cefalosporina de 3ª geração. Em 2006 foi publicado um artigo onde se caracterizou isolados de *E. coli* de vitelos resistentes ao ceftiofur. Neste artigo, dos 122 isolados de *E. coli* obtidos resistentes ao ceftiofur, todos eram sensíveis à enrofloxacin, comprovando a ideia de que os isolados resistentes ao ceftiofur no momento T0 do estudo aqui apresentado, eram simultaneamente sensíveis às fluoroquinolonas (Donaldson *et al*, 2006).

No caso do trimetoprim/sulfametoxazole, as resistências bacterianas às sulfas desenvolvem-se de modo gradual e lento mas quando surgem são persistentes e irreversíveis. Desde a descoberta do trimetoprim, na década de 1970, que esta associação de quimioterápicos é muito utilizada pelo seu largo espectro de acção. Ainda hoje é muito utilizada em animais de produção como método de profilaxia (Górniak, 2006). Justifica-se assim porque é que a percentagem de resistência dos isolados de *E. coli* é tão elevada e mantém-se pouco alterada com a exposição a uma pressão selectiva ainda mais forte.

As tetraciclinas foram introduzidas no mercado há mais de 50 anos apresentando um largo espectro de acção contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, clamídia, micoplasma, riquétsias e alguns protozoários, com boas características de farmacocinética e farmacodinamia e poucos efeitos secundários. As suas características tão favoráveis levou ao seu uso excessivo ao longo dos anos proporcionando o aparecimento de diferentes mecanismos de resistência às tetraciclinas devido a uma pressão selectiva muito elevada (Chopra & Roberts, 2001). Devido a esta aplicação abusiva das tetraciclinas em animais, quer em modo profilático (pelo leite) quer terapeuticamente, observou-se nestes últimos 50 anos a disseminação generalizada dos seus mecanismos de resistência, o que justifica a elevada percentagem de isolados de *E. coli* resistentes à tetraciclina mesmo antes da exposição ao factor de risco deste estudo.

De acordo com Call, Davis e Sawant (2008), nalguns casos a utilização de antimicrobianos não provocou nenhum aumento na taxa de bactérias resistentes, mantendo uma prevalência alta e constante mesmo na ausência de pressão selectiva, tal como se verificou no caso da tetraciclina e da ampicilina.

O modelo de regressão logística permitiu concluir se: (1) existe ou não associação entre a exposição às fluoroquinolonas no aparecimento de *E. coli* resistente a cada antimicrobiano testado e (2) se a probabilidade de resistência ao antimicrobiano varia ao longo do tempo e quando é que essa probabilidade é maior.

(1) – Ao analisar o estudo na sua totalidade, foi possível concluir que houve influência significativa da exposição às fluoroquinolonas no aparecimento de *E. coli* resistente à ampicilina, ao ceftiofur, à enrofloxacina ($p < 0,001$) e à tetraciclina ($p < 0,01$), mas não houve influência na resistência à amoxicilina/ácido clavulânico ($p = 0,15$) nem ao trimetoprim/sulfametoxazole ($p = 0,17$)

(2) – No caso da enrofloxacina a probabilidade de resistência aumenta significativamente ao longo dos 3 tempos, apesar de se observar uma ligeira diminuição em T2. Quanto à ampicilina pode-se dizer que a probabilidade de resistência aumentou ao longo dos 3 tempos mas o aumento observado de T1 para T2 não foi significativo. No caso do ceftiofur não houve aumento da resistência por influência da exposição quando comparamos os momentos T0 e T2. Por fim, no caso da tetraciclina, apesar de se observar um aumento de resistências de T0 para T1 com uma ligeira diminuição em T2, só houve

influência da exposição às fluoroquinolonas entre T0 e T1. Tanto para a enrofloxacinina como para a tetraciclina, a maior probabilidade de ocorrer resistência é em T1, para a ampicilina é em T2 e para o ceftiofur é em T0.

De acordo com o relatório anual da EFSA de 2008 (EFSA, 2010b), ainda são poucos os países que apresentam uma rede de monitorização da susceptibilidade de *Escherichia coli* comensal eficaz, sendo Portugal um dos países sem sistema de monitorização para a *E. coli* comensal. Os poucos países com programas de monitorização testaram a susceptibilidade de *E. coli* a uma vasta gama de antimicrobianos, havendo à volta de 10 que foram comuns a todos os países. No entanto, nenhum dos países testou o nível de resistência à enrofloxacinina (apenas à ciprofloxacina), à amoxicilina/ácido clavulânico nem ao trimetoprim/sulfametoxazole. Assim, não é possível avaliar a evolução das resistências para os antimicrobianos testados neste estudo com base num mesmo relatório, avaliando-se a tetraciclina, a ampicilina e o ceftiofur com base nos dados recolhidos pela EFSA no relatório de resistência a antimicrobianos nos anos de 2004 a 2007 (EFSA, 2010a) e no relatório anual de 2008 (EFSA, 2010b) e a enrofloxacinina, a amoxicilina/ácido clavulânico e o trimetoprim/sulfametoxazole com base nos dados emitidos no relatório *Antibiotic Resistance in Bacteria of Animal Origin II* [ARBAO II] referente ao ano de 2003 (Anónimo, 2004).

Até ao ano de 2007, a tetraciclina apresentou uma resistência variável entre os 15 e os 28% (EFSA, 2010a) mas no ano de 2008 foi reportada uma resistência um quanto díspar entre os diferentes países membros. Na Áustria e na Dinamarca detectaram-se percentagens bastante mais baixas do que se vinha a observar nos anos anteriores com 6,47% e 4,12% respectivamente. Enquanto que em França, em Espanha e na Holanda os valores declarados são verdadeiramente elevados com 90,67%, 44,3% e 67,32%, respectivamente (EFSA, 2010b). Na exploração em estudo, os isolados de *E. coli* apresentaram percentagens de resistência entre os 78,9% e os 94,9%, assemelhando-se com os valores declarados pela França.

A ampicilina foi declarada como apresentando uma resistência entre os 11-18% até 2007 (EFSA, 2010a) e em 2008 a percentagem de isolados resistentes variou entre os 2,3% na Áustria e os 62,71% em França (EFSA, 2010b). Neste estudo a resistência dos isolados variou entre os 69,2% e os 89,7%, novamente mais semelhante aos dados de França.

Entre 2004 e 2007 apenas 4 Estados Membros reportaram a percentagem de isolados de *E. coli* resistentes ao ceftiofur. Dos 4 países (Áustria, Estónia, França e Suíça), a Suíça foi a que apresentou o valor mais elevado com 17% (EFSA, 2010a). Em 2008, países como a Áustria, a Estónia, a Espanha, a Dinamarca e a França reportaram 100% de sensibilidade às cefalosporinas de 3ª geração (EFSA, 2010b). No entanto, o presente estudo apresenta percentagens até 27,9% de isolados resistentes.

No caso da enrofloxacinina, os estudos reportados pela EFSA utilizam a ciprofloxacina como fluoroquinolona de controlo, uma vez que representa a fluoroquinolona mais prescrita em

medicina humana (Angulo *et al*, 2000). Porém o estudo da ARBAO II apresenta valores de resistência à enrofloxacin de 20% para a França, 15% para a Itália e 1% para a Suécia (Anónimo, 2004). Neste estudo, tal como se observou para o ceftiofur, verificaram-se percentagens bastante mais elevadas do que as oficialmente declaradas, mesmo no momento T0, antes da exposição à própria enrofloxacin, atingindo o valor máximo de 98,7% em T1.

Apesar das resistências dos isolados de *E. coli* à amoxicilina/ácido clavulânico e ao trimetoprim/sulfametoxazole não sofrerem influência da exposição à enrofloxacin, é importante comparar os valores de resistência obtidos neste estudo com os valores declarados pelos relatórios europeus. No relatório da ARBAO II relativo ao ano de 2003, a Itália e a Bélgica analisaram a susceptibilidade de *E. coli* comensal à amoxicilina/ácido clavulânico obtendo uma resistência de 11% e de 26,1%, respectivamente. A percentagem de isolados resistentes à amoxicilina/ácido clavulânico obtida neste estudo foi bastante inferior, atingindo o valor máximo de 2,5%. Quanto ao trimetoprim/sulfametoxazole, os valores declarados pela Itália, Bélgica e Holanda foram 28%, 60,9% e 9%, respectivamente (Anónimo, 2004). Neste estudo verificou-se uma aproximação da percentagem de resistência aos valores da Bélgica.

Comparativamente aos dados oficiais dos relatórios, os valores de resistência obtidos das estirpes isoladas neste estudo foram superiores para todos os antimicrobianos, excepto para a amoxicilina/ácido clavulânico. Estudos já demonstraram que vitelos jovens apresentam uma maior prevalência de *E. coli* comensal resistente do que indivíduos mais adultos, provavelmente devido à elevada exposição a diferentes antimicrobianos administrados como meio profilático, metafilático ou como meio terapêutico, mas também se põe a hipótese de ser por maior transmissão fecal-oral ou por um esforço elevado no *turnover* da microbiota bacteriana do tracto gastrointestinal (DeFrancesco *et al*, 2004; Sharma *et al*, 2008). No estudo descrito por DeFrancesco em 2004 observou-se a diferença entre a presença de resistências em indivíduos adultos e vitelos, onde vacas adultas apresentaram 17% ($n = 324$) de isolados resistentes a pelo menos um antimicrobiano e oito padrões de resistência diferentes enquanto que o grupo dos vitelos apresentou 72% ($n = 395$) de isolados resistentes a pelo menos um antimicrobiano e 28 tipos de padrões diferentes, sendo que dos 10 mais comuns, 9 eram padrões de multirresistência.

A frequência de padrões de resistência dos isolados de *E. coli* foi avaliada ao longo do estudo sendo possível estabelecer relações entre os diferentes tempos de amostragem e a predominância de alguns padrões. Antes da exposição dos vitelos à enrofloxacin, os resultados dos testes de sensibilidade a antibióticos foram agrupados em 18 padrões de resistência diferentes sendo o padrão mais comum AmpTeSxt (16,83%), seguido pelo padrão AmpEnrTeSxt e por AmpXnlEnrTeSxt. Destes 18 padrões, 10 são considerados como padrões de multirresistência (resistência a 3 ou mais classes de antimicrobianos

diferentes) representando 61,38% dos isolados de *Escherichia coli* em T0. O padrão mais frequente em T0 sofreu uma evolução para AmpEnrTeSxt com a exposição à enrofloxacin em T1, sobressaindo-se dos restantes 10 com 51,89% de isolados. Este mesmo padrão manteve-se como mais frequente em T2 apesar de ter uma percentagem mais baixa (39,65%). Em T1 dos 11 padrões de resistência verificados 8 eram multirresistentes, representando 94,93% dos isolados e em T2 dos 12 padrões 8 eram multirresistentes com 80,70%. Observa-se, assim, que a exposição dos vitelos à enrofloxacin é acompanhada por um aumento significativo na incidência de multirresistência.

Com base nos dados da tabela 10 verifica-se que existe um efeito significativo da exposição à enrofloxacin na probabilidade de surgirem isolados multirresistentes ($p < 0,001$). A probabilidade de se desenvolver multirresistência aumenta significativamente entre T0 e T1 mas não é significativamente diferente entre T1 e T2, registando-se uma ligeira diminuição em T2 que pode ser explicada pela diminuição da pressão selectiva já mencionada anteriormente.

O estudo iniciou-se com 12,87% de isolados sensíveis a todos os antimicrobianos. Esta sensibilidade tornou-se nula em T1 e regressou ligeiramente um mês depois da exposição (1,75%). Inversamente, a percentagem de isolados multirresistentes aumentou consideravelmente de T0 para T1 (61,38% para 94,93%) e sofreu um ligeiro decréscimo em T2. A evolução que se verificou na taxa de sensibilidade e na taxa de multirresistência é justificada pelo aumento significativo na pressão selectiva imposta sobre os vitelos do estudo quando estes foram sujeitos às administrações de enrofloxacin no leite. Tal como foi mencionado anteriormente, este aumento de pressão selectiva, apesar de não ser o único factor de influência, é um grande impulsionador do aparecimento de novas resistências nos isolados. Relatórios de diferentes países na União Europeia, como a Áustria, a França, a Holanda e a Finlândia apresentam diferentes percentagens de multirresistências. Segundo o relatório anual de 2008 da EFSA (2010b), a Áustria declarou 2,94% de isolados de *E. coli* comensal multirresistentes em bovinos e 89,41% de isolados sensíveis a todos os antimicrobianos testados, a Holanda declarou 43,79% de multirresistentes e 29,41% de sensíveis e a França declarou 75,42% de multirresistentes e 8,47% de sensíveis. A Finlândia avalia anualmente apenas uma determinada espécie animal, sendo que a última avaliação da sensibilidade dos antimicrobianos aos isolados de *E. coli* de bovinos foi em 2006, reportando 0% de multirresistência e 94,59% de sensibilidade a todos os antimicrobianos testados (EFSA, 2007). Novamente vemos os valores do estudo a assemelharem-se aos valores declarados pela França, especialmente antes da influência da enrofloxacin e um mês depois da exposição. No estudo de Berge, Moore e Sischo (2006) obteve-se 39% de isolados de *Escherichia coli* sensíveis a todos os antimicrobianos testados, 6% com resistência simples enquanto que 55% representava isolados com multirresistência.

O aparecimento de resistências às cefalosporinas de 3ª e 4ª geração é uma preocupação na Saúde Pública e torna-se por isso importante o controlo do aparecimento de bactérias indicadoras como a *Escherichia coli* produtoras de beta-lactamases de espectro alargado, enzimas responsáveis pelo principal mecanismo de resistência às cefalosporinas. É também de igual importância a possibilidade de surgir co-resistência às cefalosporinas e às fluoroquinolonas. Na leitura dos resultados dos testes de sensibilidade a antibióticos dos isolados do momento T1 não se observaram sinergias entre o disco de ceftiofur e o disco de amoxicilina/ácido clavulânico. No entanto observaram-se 23 sinergias em T0 e 12 em T2. Este método de duplo disco é um método qualitativo e não quantitativo e verificou-se ser um método subjectivo, dependendo muito do discernimento do operador que fez as leituras. Das 23 sinergias observadas em T0, 19 correspondem a isolados resistentes ao ceftiofur e em T2, 11 das 12 sinergias observadas são coincidentes com resistências ao ceftiofur. Nestes casos onde se observou simultaneamente resistência ao ceftiofur e sinergia, pode-se afirmar com certeza que a resistência à cefalosporina de 3ª geração é devido à produção de ESBL's por parte da bactéria. Assim, pelo menos 18.81% do total de isolados obtidos em T0 e 19.3% dos isolados em T2 eram produtores de ESBL's. Porém nem todas as sinergias coincidiram com isolados resistentes ao ceftiofur e nem todos os isolados resistentes ao ceftiofur evidenciaram uma sinergia. Em ambos os casos, a má leitura das sinergias poderá estar na origem destas discrepâncias mas também é possível que não se esteja perante ESBL's mas sim perante outro tipo de cefalosporinases como as beta-lactamases AmpC. Estas enzimas, ao contrário das ESBL's, hidrolizam não só as oximino-cefalosporinas mas também as cefamicinas e têm a particularidade de serem resistentes ao ácido clavulânico (Susić, 2004). Na possibilidade de se estar perante um isolado de *E. coli* produtor de beta-lactamases AmpC, não haveria halo de inibição quer no disco do ceftiofur quer no disco de amoxicilina/ácido clavulânico, não se observando sinergia, caindo sobre o grupo de isolados resistentes ao ceftiofur mas sem halo de sinergia. Os casos em que se observou sinergia sem resistência ao ceftiofur são justificados pelo facto do TSA ser um método menos sensível do que a CIM. Se se tivesse realizado uma CIM a estes isolados provavelmente observar-se-ia uma susceptibilidade diminuída da estirpe ao ceftiofur ou poder-se-ia mesmo considerar resistente. Assim, o método de duplo disco demonstra ser um teste rápido que permite suspeitar se a estirpe produz ou não uma ESBL, mas posteriormente é necessário fazer testes confirmatórios fenotípicos, como a CIM, e genotípicos com a detecção do gene que codifica a ESBL em questão. Seria, então, benéfico para o estudo fazer uma análise molecular por meio de PCR aos isolados resistentes ao ceftiofur de modo a detectar e determinar qual o gene que codifica a ESBL que está na origem da resistência ao antimicrobiano.

Estes genes que codificam para as ESBL's estão normalmente associados a elementos de elevada mobilidade como os plasmídeos que transportam outros genes de resistência

(EMEA, 2009). Em diferentes estudos lidos para este estudo observou-se a presença simultânea de genes de resistência para as ESBL's e genes de resistência às quinolonas. Dezasseis dos 28 isolados em T0 resistentes ao ceftiofur apresentaram simultaneamente resistência à enrofloxacin. Em T1, 100% ($n = 3$) dos isolados resistentes ao ceftiofur eram simultaneamente resistentes à enrofloxacin e 11 dos 13 isolados em T2 resistentes ao ceftiofur tinham também resistência à enrofloxacin. Está novamente demonstrada a importância de aprofundar a caracterização destas resistências pois ter isolados de *Escherichia coli* com plasmídeos com os genes que codificam simultaneamente a resistência a duas classes de antimicrobianos classificados com criticamente importantes é um assunto de grande importância a nível de Saúde Pública.

2. *Salmonella* spp.

Segundo o relatório anual da EFSA referente ao ano de 2008, o país com maior prevalência de salmonela, isolada a partir de fezes de bovinos saudáveis em campo, foi a Itália com 5.4%, seguido pela Holanda com 2% (EFSA, 2010b). No estudo aqui apresentado obteve-se uma prevalência aparente de *Salmonella* spp. mínima de 4,7% (IC_{95%}: 2,0 – 10,6%) e máxima de 11,7% (IC_{95%}: 5,8 – 22,2%). A prevalência referente ao momento de recolha T0 (4,7%) encontra-se muito próxima dos valores declarados pela Itália. No entanto, ao analisar a prevalência de salmonela em T2 observa-se um valor muito acima dos declarados pelos países envolvidos no relatório da EFSA. Num estudo de vigilância de *Salmonella enterica* no Japão obteve-se 1 isolado de salmonela num conjunto de 183 amostras fecais de bovinos, o que se traduz numa prevalência de 0,5% (IC_{95%}: 0,0 - 3,0%), muito inferior aos valores apresentados neste estudo (Ishihara *et al*, 2009). Também em 2004, um estudo nos Estados Unidos revelou uma prevalência de 4,8% de *Salmonella* spp. a partir de amostras fecais (Fossler *et al*, 2004). No caso particular de Portugal, os animais de produção, excepto as aves, só são testados para salmonela em vida voluntariamente, sendo os dados declarados nos relatórios com base em bovinos doentes e não a partir de fezes de animais saudáveis. No relatório de 2008, Portugal declarou a pesquisa de salmonela em 39 bovinos, dos quais 35 eram bovinos adultos e 4 eram bovinos com menos de um ano. Todos os bovinos adultos apresentaram-se negativos e todos os vitelos acusaram a presença de *Salmonella* spp. porém as estirpes isoladas não foram serotipificadas (EFSA, 2010b). Num estudo de 2008 onde se avaliou a resposta de *E. coli* e de *Salmonella* spp. à substituição de leite medicado por leite não medicado em vitelos, obteve-se uma prevalência de salmonela de 10% no efectivo da exploração antes da intervenção mas concluiu-se que a salmonela apresentou uma excreção intermitente (Kaneene *et al*, 2008). Esta prevalência aproxima-se muito do valor obtido no momento T2. Num artigo publicado em 2009 por Alexander e os seus

colegas, observaram-se duas explorações que a uma dada altura declararam um animal infectado por *Salmonella* spp. Após esta declaração, ambas as explorações foram acompanhadas, recolhendo fezes a uma amostra representativa de vitelos saudáveis ao longo de um período de tempo. Na exploração A observou-se uma prevalência máxima de 58% ($n = 24$) e na exploração B observou-se uma prevalência máxima de 30% ($n = 82$). Comum às duas explorações foi a evolução destas prevalências ao longo do tempo. Em ambos os casos, a prevalência calculada foi tanto mais baixa quanto mais afastada do surto se recolhiam as amostras. Assim demonstrou-se que a prevalência de salmonela numa exploração não é constante ao longo do tempo (Alexander *et al*, 2009).

No momento T1 não se isolou nenhuma estirpe de *Salmonella* spp. Este momento correspondia a amostras recolhidas logo após o término da exposição às fluoroquinolonas e, por isso, o período onde a pressão selectiva imposta sobre a população bacteriana era máxima. Devido à acção bactericida da enrofloxacina e tendo em conta o protocolo intensivo aplicado nos vitelos era de esperar a ausência de isolados.

As estirpes de salmonela isoladas neste estudo foram serotipificadas segundo o esquema de Kauffmann-White, concluindo-se que se estava perante três serótipos diferentes. No momento T0, prévio à exposição às fluoroquinolonas, as amostras recolhidas positivas a salmonela demonstraram uma heterogeneidade nos serótipos, obtendo-se 3 estirpes de *S. Typhimurium*, 1 de *S. Dublin* e 1 de *S. Newport*. Estes resultados estão de acordo com os dados declarados no relatório da EFSA relativo ao ano de 2008, onde o serótipo mais frequente foi a *S. Typhimurium* (26,3%) seguido pela *S. Dublin* (23,1%). No caso da *S. Newport*, esta foi declarada como sendo uma das mais raras nos países que apresentaram as suas observações, com apenas 1,1% (EFSA, 2010b). Também a Dinamarca em 2008 declarou a *S. Typhimurium* como o serovar mais frequente no país nesse ano, seguido pelo serovar *S. Dublin* (DANMAP, 2008). A serotipificação das 7 estirpes obtidas no momento T2 demonstrou uma homogeneidade nos serótipos, estando perante 7 isolados de *S. Dublin* (100%). Este facto não vai contra a bibliografia apresentada porque, apesar de nas conclusões gerais do relatório anual da EFSA a *S. Typhimurium* ser o serótipo mais frequente em 2008, muitos países como a Bélgica, a Estónia, a Irlanda, a Holanda e o Reino Unido demonstraram que no seu caso individual, era a *S. Dublin* a mais frequente (EFSA, 2010b).

Ao analisar os resultados dos TSA efectuados aos 12 isolados de salmonela (Anexo IX), é possível observar dois panoramas: um panorama geral em que se avalia a evolução das resistências dos isolados de *Salmonella* spp. ao longo do tempo e um segundo panorama em que se avalia a evolução das resistências por serótipo, sendo que neste caso apenas se pode tirar conclusões a partir do serótipo Dublin, uma vez que este é o único serótipo comum aos dois momentos de recolha T0 e T2.

A análise da sensibilidade da *Salmonella* spp. aos antimicrobianos tornou-se difícil pelo facto de não se ter obtido isolados no momento de maior exposição à enrofloxacina (T1). Assim, as conclusões apresentadas foram obtidas analisando apenas os dados antes da exposição e um mês depois desta.

Quanto à evolução das resistências dos isolados de *Salmonella* spp. aos antimicrobianos, observou-se que estes demonstraram um aumento de sensibilidade à ampicilina, à amoxicilina/ácido clavulânico e ao trimetoprim/sulfametoxazole do momento T0 para o momento T2, atingido os 100% de sensibilidade, mas evidenciaram um aumento de sensibilidade intermédia com diminuição de sensibilidade à enrofloxacina e uma perda total de sensibilidade à tetraciclina. A sensibilidade ao ceftiofur foi sempre total.

Seguindo a mesma linha de pensamento demonstrado para a *Escherichia coli*, o aparecimento de isolados de salmonela com resistência múltipla é tanto mais provável quanto maior for a pressão selectiva imposta sobre a população bacteriana devido ao uso de antimicrobianos. DeFrancesco em 2004 propôs duas hipóteses para o aumento de resistências bacterianas. Na primeira, as explorações onde a pressão selectiva imposta fosse elevada devido ao uso exagerado de antimicrobianos, representavam uma maior probabilidade de disseminação e manutenção de bactérias resistentes. Na segunda hipótese referenciou-se o facto de explorações que se encontravam activamente a combater uma infecção criavam uma maior pressão selectiva temporária sobre as bactérias devido ao uso acrescido de antimicrobianos (DeFrancesco *et al*, 2004). Ambas as hipóteses se traduzem no mesmo: o uso de antimicrobianos, quer por uso excessivo, quer por combate a uma infecção, leva ao aumento da pressão selectiva imposta sobre a população bacteriana, favorecendo o aparecimento de bactérias com resistências aos diferentes antimicrobianos. Uma vez diminuída essa pressão selectiva, as resistências desenvolvidas diminuem, sabendo-se também que com a idade as bactérias presentes nos vitelos vão apresentando cada vez menos resistências. No caso particular deste estudo, na evolução dos isolados de T0 para T2, observou-se um aumento de sensibilidade a todos os antimicrobianos excepto à tetraciclina e à enrofloxacina. Pode-se afirmar que este aumento de sensibilidade se traduz devido à diminuição da pressão selectiva imposta e ao aumento de idade dos vitelos. Porém, a tetraciclina e a enrofloxacina demonstraram uma perda significativa de sensibilidade. O aumento na percentagem de isolados com sensibilidade intermédia à enrofloxacina é facilmente justificado pelo facto dos animais em estudo terem sido sujeitos a doses *off-label* de enrofloxacina, promovendo o desenvolvimento de resistências nas bactérias. Os isolados de *Salmonella* spp. demonstraram inicialmente uma percentagem muito elevada de resistência à tetraciclina (80%) que evoluiu para uma resistência de 42,86% e uma sensibilidade intermédia de 57,14% em T2. Devido ao uso abusivo das tetraciclinas em animais após a sua introdução no mercado, observou-se a disseminação dos seus mecanismos de resistência, o que justifica a elevada percentagem de isolados

resistentes à tetraciclina mesmo antes da exposição ao factor de risco deste estudo. Mesmo assim, no estudo de Kaneene de 2008 sobre a remoção da exposição à tetraciclina em vitelos, observou-se uma sensibilidade muito diminuída de apenas 21,4% dos isolados de *Salmonella* spp. à tetraciclina, seguido de um aumento para 45,4% de sensibilidade após a interrupção da administração de tetraciclina (Kaneene *et al*, 2008). Assim, não se pode ignorar o facto de, após a exposição ao factor de risco, a percentagem de isolados resistentes à tetraciclina ter diminuído. No entanto essa diminuição não se traduziu num aumento de susceptibilidade mas sim num aumento de sensibilidade intermédia.

Ao observar a evolução da susceptibilidade aos antimicrobianos por serótipo, apenas se pôde avaliar o serovar *S. Dublin*, uma vez que este foi o único serovar comum a ambos os momentos do estudo positivos a salmonela, T0 e T2. O serovar em questão apresentou uma diminuição de susceptibilidade com o decorrer do estudo. A sua susceptibilidade antes da exposição à fluoroquinolona foi total, com o único isolado de *S. Dublin* sensível a todos os antimicrobianos testados. No entanto verificou-se uma perda desta, ao diminuir a percentagem de isolados sensíveis para 57,1% em T2 uma vez que 3 dos 7 isolados de *S. Dublin* apresentaram-se resistentes à tetraciclina.

De acordo com o relatório mais recente da EFSA sobre zoonoses e agentes zoonóticos (EFSA, 2010b), a *Salmonella* spp. é um dos agentes zoonóticos mais vigiados, uma vez que se trata da segunda zoonose mais frequente em humanos. Neste relatório agruparam-se dados de vários países relativamente à prevalência da bactéria nas diferentes espécies e os serovares mais frequentes. A sua susceptibilidade aos diferentes antimicrobianos é demonstrada no relatório de resistência a antimicrobianos entre os anos de 2004 e 2007 (EFSA, 2010a). Segundo estes dados, 18% dos isolados apresentaram resistência à ampicilina, um valor muito inferior ao valor máximo de resistência obtido neste estudo (80%). Os valores mais elevados de resistência à ampicilina foram declarados pela Alemanha e pela Bélgica em 2003 com 45,3% e 32,2%, respectivamente (Anónimo, 2004) e pela Dinamarca em 2008 com 44% (DANMAP, 2008). Todos os restantes dados oficiais publicados em relatórios quer pela EFSA referente aos anos entre 2004 e 2007 quer pelo ARBAO II demonstraram uma resistência sempre inferior a 20%. Quanto ao ceftiofur, a sua sensibilidade é total, quer nos resultados obtidos no estudo quer nos dados oficiais publicados pela EFSA (EFSA, 2010a). Apenas a Alemanha declarou, em 2003, uma resistência de 0,3% a esta cefalosporina de 3ª geração (Anónimo, 2004). A resistência desenvolvida à tetraciclina antes da exposição ao factor de risco neste estudo é muito elevada atingindo os 80%. Em nenhum dos relatórios oficiais publicados se atinge um nível tão alto de resistência. A EFSA declara 24% de resistência, o DANMAP dá uma resistência de 39% e o ARBAO II declara a Alemanha como o país com maior taxa de resistência à tetraciclina, com 46,1% (EFSA, 2010a; DANMAP, 2008; Anónimo, 2004). Um mês após terminar a exposição à enrofloxacin, a resistência à tetraciclina diminuiu para valores mais

semelhantes aos apresentados nos relatórios (42,86%), estando muito próximo dos valores da Dinamarca e da Alemanha.

Em relação à amoxicilina/ácido clavulânico, trimetoprim/sulfametoxazole e enrofloxacin a o relatório sobre a resistência a antimicrobianos entre os anos de 2004-2007 da EFSA não apresenta resultados. Assim sendo, os resultados deste trabalho em relação aos antimicrobianos em questão são comparados com dados publicados pelo ARBAO II. Neste relatório, quatro países apresentaram resultados quanto à resistência da *Salmonella* spp. à amoxicilina/ácido clavulânico: Alemanha com 1,1%, Inglaterra com 0,1% e França e Irlanda com 0%. No trabalho aqui apresentado a resistência a este antimicrobiano iguala-se à França e à Irlanda com total susceptibilidade. Assemelhando-se a este último caso, a enrofloxacin, que neste estudo demonstrou 0% de resistências, apresentou 100% de sensibilidade na Bélgica, na Finlândia e na França. Apenas a Irlanda apresentou 0,8% de resistências. Vinte por cento dos isolados de *Salmonella* spp. no primeiro momento de recolhas (T0) demonstram-se resistentes ao trimetoprim/sulfametoxazole mas em T2 essa resistência desapareceu. Os dados oficiais declararam uma resistência de 6,8% na Bélgica, 6% na Inglaterra e 5,3% na Holanda. O valor mínimo atingido foi 0,5% pela França. Neste caso, os resultados obtidos não se igualam a nenhum dos países presentes no relatório do ARBAO II (Anónimo, 2004).

Devido ao baixo número de isolados de *Salmonella* spp. não foi possível estabelecer uma relação estatística entre a influência das fluoroquinolonas e o aparecimento de isolados de *Salmonella* spp. multirresistentes.

VI – CONCLUSÃO

Ao terminar este estudo pretendeu-se concluir se houve ou não influência da exposição dos animais à enrofloxacinina em doses *off-label* no aparecimento de isolados de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. multirresistentes.

Em primeiro lugar, quanto aos resultados da *E. coli* à exposição às fluoroquinolonas, determinou-se que houve uma influência positiva no desenvolvimento de resistências à ampicilina, ao ceftiofur, à enrofloxacinina e à tetraciclina mas sem influência no aparecimento de resistências à amoxicilina/ácido clavulânico e ao trimetoprim/sulfametoxazole. A evolução geral das resistências demonstrou seguir uma linha esperada, ao aumentar no momento de maior exposição ao antimicrobiano e ao diminuir após o fim desta, evidenciando bem a acção de uma pressão selectiva intensa sobre a população bacteriana dos bovinos. Foi também possível concluir que houve uma influência significativa das fluoroquinolonas no aparecimento de isolados multirresistentes de *Escherichia coli*. Quanto à percentagem de isolados produtores de beta lactamases de espectro alargado, o valor obtido foi bastante significativo atingindo quase 20%, mesmo nos isolados obtidos antes da exposição à enrofloxacinina.

Em segundo lugar, não foi possível determinar se houve influência da exposição às fluoroquinolonas no aparecimento de estirpes de *Salmonella* spp. multirresistentes uma vez que os dados obtidos não foram suficientes para se poder fazer uma avaliação estatística. Quanto à prevalência de *Salmonella* spp. esta demonstrou ser inicialmente semelhante à prevalência declarada pela Itália em 2008, no entanto a prevalência obtida após a exposição foi muito superior a qualquer dado oficial, aproximando-se apenas dos valores obtidos em estudos desenvolvidos em explorações pontuais. O serótipo mais frequente neste estudo foi *Salmonella enterica* subespécie *enterica* serovar Dublin, demonstrando-se sensível a todos os antimicrobianos excepto em alguns casos em que se desenvolveu resistência à tetraciclina.

Para maximizar a eficácia dos antimicrobianos e minimizar o desenvolvimento de resistências é imperativo sensibilizar para um uso responsável de todo e qualquer antimicrobiano, incluindo as quinolonas. Um uso responsável traduz-se pela escolha correcta do antibiótico a aplicar em cada situação, preferindo um antimicrobiano de espectro mais estreito a um de espectro mais abrangente para combater um agente específico (Li, 2005).

É essencial, por isso, divulgar-se o uso prudente de antimicrobianos, não só a nível dos médicos veterinários e dos produtores de animais de produção mas também ao nível das autoridades reguladoras, da indústria farmacêutica e dos distribuidores de fármacos.

É necessário ter em mente que as fluoroquinolonas são uma classe de antimicrobianos muito utilizada em animais de produção mas também em medicina humana, o que aumenta a sua importância quando se avalia o desenvolvimento de resistências bacterianas a este grupo de antimicrobianos, pois o aparecimento de resistências em bactérias como a *Salmonella* spp. pode implicar a ineficácia dos tratamentos em infecções em humanos.

VII - BIBLIOGRAFIA

- Alexander, K.A., Warnick, L.D., Cripps, C.J., McDonough, P.L., Grohn, Y.T., Wiedmann, M., Reed, K.E., James, K.L., Soyer, Y. & Ivanek, R. (2009). Fecal shedding of, antimicrobial resistance in, and serologic response to *Salmonella* Typhimurium in dairy calves. *Journal of the American Veterinary Medicine Association*. Vol. 235, 739-48.
- Ambler, R.P. (1980). The structure of beta-lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* Vol. 289, 321–331.
- Angulo, F., Johnson, K., Tauxe, R. & Cohen, M. (2000). Origins and consequences of antimicrobial-resistant nontyphoidal *Salmonella*: implications of the use of fluoroquinolones in food animals. *Microb Drug Resist*. Vol. 6, 77-83
- Anónimo, Antibiotic resistance in bacteria of animal origin – II [ARBAO II]. (2004). Collection of routine susceptibility data. Report for the ARBAO II. www.dfvf.dk, acedido em Junho de 2010.
- Azevedo, C., Maia, I. & Tavares, N. (2010). Antibioterapia em bovinos: princípios de utilização e suas implicações na saúde pública. *Veterinary Medicine edi. Portuguesa*. Julho/Agosto, 41-56.
- Bale, J. A., Pinna, E. M., Threlfall, E. J., & Ward, L. R. (2007). *Kauffmann-White Scheme 2007: Salmonella Identification - Serotypes and Antigenic Formulae*. Health Protection Agency.
- Baptista, B. (2007). *Caracterização dos mecanismos moleculares de resistência às fluoroquinolonas em estirpes de Escherichia coli de origem animal*. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Clínica. Lisboa: Faculdade de Medicina – Universidade de Lisboa
- Berge, A.C., Lindeque, P., Moore, D.A. & Sisco, W.M. (2005). A clinical trial evaluating prophylactic and therapeutic antibiotic use on health and performance of preweaned calves. *J. Dairy Science*. Vol. 88, 2166-2177.
- Berge, A.C., Moore, D.A. & Sisco, W.M. (2006). Field trial evaluating the influence of prophylactic and therapeutic antimicrobial administration on antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* in dairy calves. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 72, 3872-3878.
- Berge, A.C., Moore, D.A., Besser, T.E. & Sisco, W.M. (2009). Targeting therapy to minimize antimicrobial use in preweaned calves: effects on health, growth and treatment costs. *J. Dairy Sci*. Vol. 92, 4707-4714.
- Blau, D.M., McCluskey, B.J., Ladely, S.R., Dargatz, D.A., Fedorka-Cray, P.J., Ferris, K.E. & Headrick, M.L. (2005). *Salmonella* in Dairy Operations in the United States: Prevalence and Antimicrobial Drug Susceptibility. *Journal of Food Protection*. Vol. 68, 696-702
- Call, D.R., Davis, M.A. & Sawant, A.A. (2008). Antimicrobial resistance in beef and dairy cattle production. *Animal Health Research Reviews*. Vol. 9, 159-167.
- Carson, C.A., Reid-Smith, R., Irwin, R.J., Martin, W.S. & McEwen, S.A. (2008). Antimicrobial resistance in generic fecal *Escherichia coli* from 29 beef farms in Ontario. *Can. J. Vet. Res*. Vol. 72, 119-128.

- Chopra, I. & Roberts, M. (2001). Tetracycline Antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* Vol. 65, 232-260.
- CLSI (2008). Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. Approved Standard: Third Edition M31-A3. CLSI, Wayne, PA, USA.
- Cowan, S.T. (1974). Gram Negative Facultatively Anaerobic Rods. In R.E. Buchanan & N.E. Gibbons *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (8th ed.).(pp. 290-384). Baltimore: The Williams & Wilkins Company
- Daniels, J.B., Call, D.R., Hancock, D., Sisco, W.M., Baker, K. & Besser, T.E. (2009). Role of ceftiofur in selection and dissemination of *bla*_{CMY-2}-mediated cephalosporin resistance in *Salmonella enterica* and commensal *Escherichia coli* isolates from cattle. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 75, 3648-3655.
- DANMAP (2008). *Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark*. ISSN 1600-2032.
- Davis, M.A., Hancock, D.D., Besser, T.E., Daniels, J.B., Baker, K.N. & Call, D.R. (2007). Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovar Dublin isolates from beef and dairy sources. *Veterinary Microbiology*. Vol. 119, 221-230.
- DeFrancesco, K.A., Cobbold, R.N., Rice, D.H., Besser, T.E. & Hancock, D.D. (2004). Antimicrobial resistance of commensal *Escherichia coli* from dairy cattle associated with recent multi-resistant salmonellosis outbreaks. *Veterinary Microbiology*. Vol. 98, 55-61.
- Direcção Geral de Veterinária (2010) – Lista de Quinolonas e Enrofloxacinas aprovadas para Bovinos, Dr^a Maria Helena Silveiras Teodoro Ponte, Divisão de Gestão e Autorização de Medicamentos e Produtos Veterinários; Direcção de Serviços de Medicamentos e Produtos de Uso Veterinário. Lisboa: 2010.
- Domingos, I.C.S. (2010). *Prevalência, Serótipos e Susceptibilidade a antibióticos de Salmonella spp. em explorações de suínos em Portugal*. Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Donaldson, S.C., Straley, B.A., Hegde, N.V., Sawant, A.A., DebRoy, C. & Jayarao, B.M. (2006). Molecular Epidemiology of Ceftiofur-resistant *Escherichia coli* isolates from dairy calves. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 72, 3940-3948.
- Duarte, E.M.L. (1999). *O papel dos larídeos como portadores e disseminadores de Salmonella spp.* Dissertação de Mestrado em Ciências do Mar/Recursos Marinhos. Porto: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto.
- ECDC, EFSA, EMEA e SCENIHR (2009). Joint opinion on antimicrobial resistance (AMR) focused on zoonotic infections. *EFSA Journal* (2009). 7, 1372 e EMEA/CVMP/447259/2009.
- European Medicine Agency (2006): Reflection paper on the use of fluoroquinolones in food-producing animals in the European Union: Development of resistance and impact on human and animal health. *EMEA/CVMP/SAGAM/184651/2005- consultation*. London: EMEA

- European Medicine Agency (2009): Reflection paper on the use of third and fourth generation cephalosporins in food producing animals in the European Union: development of resistance and impact on human and animal health. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. Vol. 32, 515-33.
- European Food Safety Authority [EFSA]. (2007). The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2006, *The EFSA Journal* 2007,130.
- European Food Safety Authority [EFSA]. (2010a). The Community Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from animals and food in the European Union in 2004-2007. *EFSA Journal* 2010; 8(4):1309.
- European Food Safety Authority [EFSA]. (2010b). The Community Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008, *EFSA Journal*; 2010 8(1):1496.
- Fàbrega, A., Sánchez-Céspedes, J., Soto, S. & Vila, J. (2008). Quinolone resistance in the food chain. *International Journal of Antimicrobial Agents*. Vol. 31, 307-315
- Fossler, C.P., Wells, S.J., Kaneene, J.B., Ruegg, P.L., Warnick, L.D., Bender, J.B., Godden, S.M., Halbert, L.W., Campbell, A.M. & Zwald, A.M. (2004). Prevalence of *Salmonella* spp. on conventional and organic dairy farms. *Journal of the American Veterinary Medical Association* Vol. 225, 567-73
- Gay, K., Robicsek, A., Strahilevitz, J., Park, C.H., Jacoby, G., Barrett, T.J., Medalla, F., Chiller, T.M. & Hooper, D.C. (2006). Plasmid-mediated quinolone resistance in non-typhi serotypes of *Salmonella enterica*. *Clinical Infectious Diseases*. Vol. 43, 297-304.
- Górniak, S.L. (2006). Quimioterápicos. In H. S. Spinosa, S. L. Górniak & M. M. Bernardi, *Farmacologia aplicada à medicina veterinária* (4ª ed.). (pp. 453-464). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan
- Grimont, P. A. & Weill, F. X. (2007). *Antigenic Formulae of the Salmonella Serovars*. (9th ed.) WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella.
- Guibourdenche, M., Roggentin, P., Mikoleit, M., Fields, P. I., Bockemuhl, J., Grimont, P. A. et al. (2009). Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res.Microbiol.*
- Guimarães, S. (2006). Quinolonas. In S. Guimarães, D. Moura & P. Soares da Silva, *Terapêutica Medicamentosa e as suas Bases Farmacológicas: Manual de Farmacologia e Farmacoterapia* (5ª ed.). (pp. 700-707). Porto: Porto Editora
- Hawkey, P.M. & Jones, A.M. (2009). The changing epidemiology of resistance. *J. Antimicrobial Chemotherapy*. Vol. 64, 3-10
- Hendriksen, R. S. & Larsen, J. N. (2004). Laboratory Protocols: Training Course - Serotyping of *Salmonella enterica* O and H antigen. *Global Salm-Surv* (6th ed.). WHO.
- Ishihara, K., Takahashi, T., Morioka, A., Kojima, A., Kijima, M., Asai, T. & Tamura, Y. (2009). National surveillance of *Salmonella enterica* in food-producing animals in Japan. *Acta Veterinaria Scandinavica*. Vol 51
- ISO 6579:2002 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. - Amendment 1: Annex D: Detection of *Salmonella* spp.

in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage (2007).

- Jacoby, G.A., Chow, N. & Waites, K.B. (2003). Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol 47, 559-562
- Kaneene, J.B., Warnick, L.D., Bolin, C.A., Erskine, R.J., May, K. & Miller, R. (2008). Changes in tetracycline susceptibility of enteric bacteria following switching to nonmedicated milk replacer for dairy calves. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 46, 1968-1977.
- Li, X.Z. (2005). Quinolone resistance in bacteria: emphasis on plasmid-mediated mechanisms. *International Journal of Antimicrobial Agents*. Vol 25, 453-463
- Lindgren, P. K., Karlsson, A, e Hughes, D. (2003). Mutation rate and evolution of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol. 47: 3222-3232.
- Martinez-Martinez, L., Pascual, A. & Jacoby, G.A. (1998). Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*. Vol 351, 797-799
- McDaniels, A.E., Rice, E.W., Reyes, A.L., Johnson, C.H., Haugland, R.A. & Stelma Jr., G.N. (1996). Confirmational Identification of *Escherichia coli*, a Comparison of Genotypic and Phenotypic Assays for Glutamate Decarboxylase and -D-Glucuronidase. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 62, 3350-54
- Mendonça Machado, A. (1946). *Boletim Pecuário* Ano XIV nº1. p. 47-49.
- Nulsen, M.F., Mor, M.B. & Lawton, D.E. (2008). Antibiotic resistance among indicator bacteria isolated from healthy pigs in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*. Vol. 56, 29-35.
- Papich, M.G., Riviere, J.E. (2001). Fluoroquinolone antimicrobial drugs. In H. R. Adams, *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. (8th ed.). (pp. 898-917). Iowa: Iowa State University Press
- Paterson, D.L. (2006). Resistance in Gram-Negative Bacteria: Enterobacteriaceae. *The American Journal of Medicine*. Vol 119, 520-528
- Paterson, D.L. & Bonomo, R.A. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiology Rev*. Vol. 18, 657-686
- Poirel, L., Rodriguez-Martinez, J.M., Mammeri, H., Liard, A. & Nordmann, P. (2005). Origin of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinant QnrA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol. 49, 3523-3525
- Prescott, J.F. (2008). Antimicrobial use in food and companion animals. *Animal Health Research Reviews*. Vol. 9, 127-133.
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J. & Leonard, F.C. (2002). Enterobacteriaceae. In *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. (pp. 106-123). Iowa: Blackwell Publishing
- Rice, E.W., Johnson, H.C., Dunnigan, M.E. & Reasoner, D.J. (1993). Rapid glutamate decarboxylase assay for detection of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol*. Vol 59, 4347-4349

- Robicsek, A., Sahm, D.F., Strahilevitz, J., Jacoby, G.A. & Hooper, D.C. (2005). Broader Distribution of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol. 49, 3001-3003
- Ruiz, J., Gómez, J., Navia, M.N., Ribera, A., Sierra, J.M., Marco, F., Mensa, J. & Vila, J. (2002). High prevalence of nalidixic acid resistant, ciprofloxacin susceptible phenotype among clinical isolates of *Escherichia coli* and other *Enterobacteriaceae*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 42, 257-261
- Salmonella* Antibiotic Resistance, National Centre for Zoonosis Research. Acedido em Jul, 22, 2010, disponível em <http://www.zoonosis.ac.uk/research/salmonella-antibiotic.html>
- Sárközy, G. (2001). Quinolones: a class of antimicrobial agents. *Veterinary Medicine – Czech*. Vol. 46, 257-274
- Sato, K., Bartlett, P.C. & Saeed, M.A. (2005). Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates from dairy farms using organic versus conventional production methods. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* Vol. 226, 589-594.
- Sharma, R., Munns, K., Alexander, T., Entz, T., Mirzaagha, P., Yanke, L. J., Mulvey, M., Topp, E. & McAllister, T. (2008). Diversity and Distribution of Commensal Fecal *Escherichia coli* Bacteria in Beef Cattle Administered Selected Subtherapeutic Antimicrobials in a Feedlot Setting. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 74, 6178-6186.
- Singer, M., Berg, P. (1991). The Recombinant DNA Breakthrough. In *Genes & Genomes*. (pp. 223-241). CA: University Science Books
- Stilwell, G. (2007, Maio-Junho). Surto de diarreia por *Salmonella enteritidis* num viteleiro de engorda. *Veterinary Medicine edi. Portuguesa*. p. 61-70
- Susić, E. (2004). Mechanisms of Resistance in Enterobacteriaceae towards beta-lactamase antibiotics. *Acta Med Croatica*. Vol. 58, 307-312
- Tindall, B.J., Grimont, P.A., Garrity, G.M. & Euzéby, J.P. (2005). Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiology*. Vol. 55, 521-524.
- Tran, J.H., Jacoby, G.A. (2002). Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol 99, 5638-5642
- van den Bogaard, A.E. & Stobberingh, E.E. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *Int. J. Antimicrobial Agents*. Vol. 14, 327-335.
- Walker, R.D., Dowling, P.M. (2006). Fluoroquinolones. In S. Giguère, J.F. Prescott, J.D. Baggot, R.D. Walker & P.M. Dowling, *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine* (4th ed.). (pp. 263-284). Iowa: Blackwell Publishing
- World Health Organization (1998). Use of quinolones in food animals and potential impact on human health. Report of a WHO meeting, Geneva, Switzerland. WHO/EMC/ZDI/98.10.
- World Health Organization (2009). Critically important antibacterial agents for human medicine for risk management strategies of non-human use. Copenhagen, Dinamarca, 2009 (3rd edition).

Wray, C., Davies, R.H. (2000). *Salmonella* infections in Cattle. In C. Wray & A. Wray, *Salmonella in domestic animals*. (pp. 169-190). Oxon: CABI Publishing

Anexo I. Resumo das Actividades Realizadas durante o Estágio na Battenkill Veterinary Bovine, Nova Iorque, entre Outubro e Dezembro de 2009.

Actividades Realizadas	Nº de Ocorrências	
	Bovinos	Caprinos
Actividade Diária:		
Saneamento Bovino		
Recolhas de Sangue		
Diagnóstico de gestação: Por Palpação Rectal ou Ecografia Transrectal	≈2500	
Actividade Clínica:		
Patologia Respiratória	4	
Pneumonia por Aspiração	1	
Quadro Neurológico	2	1
Quadro de Diarreia	4	
Intoxicações	4 (Vitelos)	10
Vaca Caída	4	
Lesão do Nervo Ciático	2	
Reacção Anafilática	3	
Hérnia Umbilical	2 (Vitelos)	
Úlcera Abomasal	2	
Abcessos	5	
Mastite	2	
Piómetra	1	
Descorna	≈50 Vitelos	
Parto Distócico	7	
Actividade Cirúrgica:		
Deslocamento de Abomaso		
À Direita	7	
À Esquerda	9	
Não Diferenciado	5	
Prolapso Uterino	4	
Prolapso Vaginal	2	
Cesariana	3	
Fetotomia	3	
Laparotomia Exploratória	2	
Castração	2	2
Claudicação/Ortopedia:		
Aparo correctivo de cascos	2	

Anexo II. Resumo da comunicação livre apresentada nas XIV Jornadas da APB, Elvas, 2010

RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS EM ISOLADOS DE *SALMONELLA* SPP. E *ESCHERICHIA COLI* DE VITELOS

Madalena Centeno¹, Felisbela Loução¹, Rui Pereira-Silva¹, Natacha Couto¹, Filipa Matos Baptista^{1,2}, Miguel Saraiva-Lima¹, Constança Pomba¹.

¹CIISA, Laboratório de Resistência aos Antibióticos e Biocidas, Faculdade de Medicina Veterinária (FMV), Universidade Técnica de Lisboa (UTL), Lisboa, Portugal.

²Department of Large Animal Sciences, Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen, Frederiksberg, Denmark

Em 2008, a salmonelose foi novamente a segunda doença zoonótica mais reportada em humanos na Europa (EFSA, 2010). As β -lactamases de espectro alargado (ESBL) foram identificadas após a introdução das oximino-cefalosporinas em 1980 para o tratamento de infecções bacterianas graves no homem (Bradford, 2001). *Escherichia coli* produtoras de ESBL são cada vez mais comuns em humanos e nos animais. Este estudo preliminar teve como objectivo caracterizar os padrões de susceptibilidade em *Salmonella* e *E. coli* isoladas de vitelos provenientes de duas explorações de cria nas regiões do Ribatejo-Oeste e Alentejo. Um total de 4 *Salmonella* spp. foram isoladas em fezes de vitelos ($n=46$) e um isolado *E. coli* ($n=46$) foi caracterizado por vitelo, no período entre Fevereiro e Março de 2010. As amostras foram analisadas para detecção de *Salmonella* spp. usando a técnica recomendada pela *International Organization for Standardization* (ISO 6579:2002, Anexo D). As colónias consideradas típicas ou suspeitas de *Salmonella* spp. foram semeadas em Triple Sugar Iron agar (TSI, *Scharlau*) e incubadas a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{h} \pm 3\text{h}$. Posteriormente realizou-se a confirmação bioquímica com os sistemas de identificação comerciais, API 20E (*Biomérieux*). As colónias identificadas como *Salmonella* foram plaqueadas em agar nutritivo (*Biokar*, Beauvais, França), incubadas a 37°C durante 18-24h e serotipificadas para o género pelo método de aglutinação com antisoro Omni-O da *Biorad* (Madrid, Espanha) de acordo com o esquema *Kauffmann-White*. A identificação de *E. coli* foi realizada genotipicamente por amplificação do gene *gadA* por PCR de acordo com McDaniels et al. (1996). Os testes de susceptibilidade foram efectuados através do método de difusão por discos com seguintes antibióticos: enrofloxacina (5 μg), ampicilina (10 μg), amoxicilina/ácido clavulânico (20/10 μg), ceftiofur (30 μg), tetraciclina (30 μg) e trimetopim/sulfametoxazol (1,25/23,7 μg) e os resultados interpretados de acordo com as normas M31-A3 (CLSI, 2008). As estirpes produtoras de ESBL foram detectadas pelo método de disco duplo para detecção de sinergias.

Foi observada uma taxa de mortalidade de 10,8% ($n=5$) entre os vitelos testados. A frequência de isolamento de *Salmonella* foi de 8,7% ($n=4$; 1 caso de mortalidade). A taxa de resistência de *E. coli* foi de 76,1% para a tetraciclina (Te), 60,9% para ampicilina (Amp); 50% para trimetoprim/sulfametoxazol (Sxt); 45,7% para enrofloxacina (Enr); 8,7% para o

ceftiofur (Xnl) e 4,3% para a associação amoxicilina/clavulanato (Amc). Das estirpes isoladas de *E. coli* 6,5% ($n=3$) eram produtoras de ESBL. Das 46 estirpes isoladas de *E. coli*, sete não apresentaram resistência a qualquer dos antibióticos testados, 6 foram resistentes apenas a 1 antibiótico, 9 tinham resistência a duas classes diferentes de antibiótico e 24 foram multirresistentes (resistentes a 3 ou mais classes de antibióticos). O padrão mais frequente de resistência foi Amp^REnr^RTe^RSxt^R ($n=8$).

A detecção de *Salmonella* e *E.coli* produtoras de ESBL em fezes de vitelos justifica a realização de mais estudos tendo em vista a avaliação de potenciais riscos para a saúde pública e saúde animal. Este estudo demonstrou uma elevada frequência de resistência aos antibióticos em estirpes isoladas em vitelos com idade média de 15 dias. Detectaram-se ainda estirpes de *E. coli* multirresistentes, o que pode comprometer as escolhas terapêuticas.

Anexo III. Resumo submetido para o IV Congresso ESCAIDE 2010, Lisboa, 2010

FLUOROQUINOLONES SELECTIVE PRESSURE INDUCES THE RISING OF MULTIDRUG-RESISTANT *ESCHERICHIA COLI* ISOLATES FROM CALVES

Madalena Centeno (1), F. Loução (1,2), F. Matos Baptista (2,3), N. Couto (1,2), M. Saraiva-Lima (2), C. Pomba (1,2).

1. Laboratory of Antimicrobial and Biocide Resistance, Interdisciplinary Centre of Research in Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Technical University of Lisbon, Portugal.

2. Interdisciplinary Centre of Research in Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Technical University of Lisbon, Portugal

3. Department of Large Animal Sciences, Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen, Frederiksberg C, Denmark

Few studies clearly demonstrate that the use of antimicrobial agents in veterinary medicine affects the antimicrobial resistance in bacteria isolated from food-producing animals. In this study the influence of enrofloxacin administration in milk (50 mg/L) and the susceptibility of *E. coli* isolates from faeces samples of healthy calves (n=106) from a Portuguese farm was evaluated. Each calf was sampled at 2 (T0, before enrofloxacin administration), 6 (T1, after 3 administrations of 5 consecutive days with a 5 day interval each) and 10 weeks of age (T2). Between February and May 2010 were obtained 237 *E. coli* isolates that were identified by the *gadA* PCR (McDaniels et al., 1996). Antimicrobial susceptibility testing was done by the disk diffusion method with: enrofloxacin (5 µg), ampicillin (10 µg), amoxicillin/clavulanic acid (20/10 µg), ceftiofur (30 µg), tetracycline (30 µg) and trimethoprim/sulfamethoxazole (1.25/23.7 µg). The ESBL-producing isolates were detected by the double disk diffusion test. Results were interpreted according to M31-A3 (CLSI, 2008). Data was analysed by the logistic regression model (SAS v9.2 software). *E. coli* resistance to ampicillin was 69,23% (T0), 79,75% (T1) and 89,66 (T2), to amoxicillin/clavulanic acid 0,00%, 2,53% and 1,72%, to ceftiofur 27,88%, 3,80% and 22,41%, to enrofloxacin 35,58%, 98,73% and 72,41%, to tetracycline 78,85%, 94,94% and 94,83% and to trimethoprim/sulfamethoxazole 64,42%, 77,22% and 70,69%. ESBL-producing isolates were 22,43% (T0), 0,00% (T1) and 20,69% (T2). There was high significant difference ($P<0,001$) between multidrug-resistant strains raise in *E. coli* isolates from T0, T1 and T2. This study demonstrates that calves' off-label exposure to fluoroquinolones influences the emergence of fluoroquinolone and multidrug-resistance among *E. coli* isolates. Further scientific evidence-based studies are warranted to evaluate the public health risk.

Keywords: Fluoroquinolones, multidrug-resistance, *Escherichia coli*, ESBL, calves

Anexo IV. Tabela de dados referentes os cento e seis vitelos amostrados no estudo: Número de Sistema de Identificação Animal, Data de Nascimento, Sexo e Origem

Nº Ordem	Nº de SIA	Data de Nascimento	Sexo	Origem
	PT			
VF1	115459678	13.01.2010	M	Kiesta
VF2	515910153	23.01.2010	F	Prado
VF3	915910151	21.01.2010	F	Prado
VF4	315910154		F	
VF5	915459679	16.01.2010	M	Kiesta
VF6	615085266	29.12.2009	F	Eusébio Viana
VF7	115910150	21.01.2010	F	Prado
VF8	315909462	14.01.2010	M	Kiesta
VF9	715910152		F	
VF10	415085267	08.01.2010	F	Eusébio Viana
VF11	315894367	23.01.2010	M	Horta
VF12	715904519	17.02.2010	M	Infanta
VF13	315904516	13.02.2010	M	Infanta
VF14	915491377	15.02.2010	M	
VF15	415904520	18.02.2010	M	Infanta
VF16	715904514	08.02.2010	M	Infanta
VF17	514921983	03.02.2010	F	Almerim
VF18	515904515	11.02.2010	M	Infanta
VF19	315459115	02.02.2010	M	Bica Nova
VF20	914921986	11.02.2010	M	Almerim
VF21	714921982	31.01.2010	M	Almerim
VF22	915787373	06.02.2010	M	M.Espada
VF23	615894370	05.02.2010	M	Horta
VF24	915459112	21.01.2010	M	Bica Nova
VF25	115910179	22.02.2010	M	Nascedios
VF26	015910184	23.02.2010	M	Nascedios
VF27	915459117	08.02.2010	M	Bica Nova
VF28	615910167	15.02.2010	M	Nascedios
VF29	215910183	23.02.2010	M	Nascedios
VF30	715887379	21.02.2010	M	M.Espada
VF31	215894369	05.02.2010	M	Horta
VF32	715910176	21.02.2010	M	Nascedios
VF33	515910177	21.02.2010	M	Nascedios

Nº Ordem	Nº de SIA	Data de Nascimento	Sexo	Origem
VF34	215910164	13.02.2010	M	Nascedios
VF35	615910162	13.02.2010	M	Nascedios
VF36	415910182	24.02.2010	M	Nascedios
VF37	615910181	23.02.2010	M	Nascedios
VF38	815910161	11.02.2010	M	Nascedios
VF39	515459114	25.01.2010	M	Bica Nova
VF40	415894351	29.12.2009	M	Horta
VF41	915910170	18.02.2010	M	Nascedios
VF42	115015317	19.02.2010	M	Coelheiros
VF43	015015308	03.02.2010	M	Coelheiros
VF44	815410673	23.02.2010	M	Mateus
VF45	815015309	12.02.2010	M	Coelheiros
VF46	015910189	02.03.2010	M	Nascedios
VF47	715910195	09.03.2010	M	Nascedios
VF48	415910200	13.02.2010	M	Nascedios
VF49	515910196	12.03.2010	M	Nascedios
VF50	415910187	27.02.2010	M	Nascedios
VF51	215910188	01.03.2010	M	Nascedios
VF52	115910193	07.03.2010	M	Nascedios
VF53	715910190	02.03.2010	M	Nascedios
VF54	915910199	13.03.2010	M	Nascedios
VF55	315910197	12.03.2010	M	Nascedios
VF56	115910198	13.03.2010	M	Nascedios
VF57	615910186	26.02.2010	M	Nascedios
VF58	815930985	23.02.2010	M	Infanta
VF59	715491378	22.02.2010	M	Infanta
VF60	515491379	05.03.2010	M	Infanta
VF61	715930990	04.03.2010	M	Infanta
VF62	015930989	02.03.2010	M	Infanta
VF63	515461532	13.02.2010	M	Loural
VF64	015932421	01.03.2010	M	Casão
VF65	915897377	08.02.2010	M	Casão
VF66	515932414	24.02.2010	M	Casão
VF67	115931082	14.03.2010	M	Infanta
VF68	315930997	13.03.2010	M	Infanta
VF69	915930999	14.03.2010	M	Infanta
VF70	515931085	18.03.2010	M	Infanta

Nº Ordem	Nº de SIA	Data de Nascimento	Sexo	Origem
VF71	915931088	20.03.2010	M	Infanta
VF72	715931003	15.03.2010	M	Infanta
VF73	415931090	22.03.2010	M	Infanta
VF74	115931087		M	
VF75	715931089		M	
VF76	915931002	15.03.2010	M	Infanta
VF77	915931083	15.03.2010	M	Infanta
VF78	315931086	18.03.2010	M	Infanta
VF79	315931081	12.03.2010	M	Infanta
VF80	415992404	08.03.2010	M	Coelheiros
VF81	615992403	06.03.2010	M	Coelheiros
VF82	715461593	18.03.2010	M	Loural
VF83	415992409		M	
VF84	315461590	17.03.2010	M	Loural
VF85	715964711	24.03.2010	M	Bica Nova
VF86	815992402	06.03.2010	M	Coelheiros
VF87	415015325	01.03.2010	M	Coelheiros
VF88	715459118	27.02.2010	M	Bica Nova
VF89	715461598	19.03.2010	M	Loural
VF90	915992411	13.03.2010	M	
VF91	015992401	03.03.2010	M	Coelheiros
VF92	115461596	19.03.2010	M	Loural
VF93	415964708	22.03.2010	M	Bica Nova
VF94	015992406	12.03.2010	M	Coelheiros
VF95	615992408	12.03.2010	M	
VF96	815461588	17.03.2010	M	Loural
VF97	015459121	06.03.2010	M	Bica Nova
VF98	915894388	09.03.2010	M	Horta
VF99	415894390	10.03.2010	M	Horta
VF100	715461574	01.03.2010	M	Loural
VF101	115894387	05.03.2010	M	Horta
VF102	715894389	09.03.2010	M	Horta
VF103	815964704	09.03.2010	M	Bica Nova
VF104	215894391	11.03.2010	M	Horta
VF105	315461595	19.03.2010	M	Loural
VF106	515894385	26.02.2010	M	Horta

Anexo V. Tabela informativa sobre as datas de colheita, idade dos vitelos (em dias) nos momentos T0, T1 e T2 e intervalo (em dias) entre colheitas T0-T1 e T1-T2.

Nº Ordem	Data de Colheitas			Idade (dias)			Intervalo entre Recolhas	
	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0-T1	T1-T2
VF1	29.01.2010	1.03.2010	5.04.2010	16	47	82	31	35
VF2	29.01.2010	1.03.2010	5.04.2010	6	37	72	31	35
VF3	29.01.2010	Morreu	Morreu	8				
VF4	29.01.2010	Morreu	Morreu					
VF5	29.01.2010	1.03.2010	5.04.2010	13	44	79	31	35
VF6	29.01.2010	1.03.2010	5.04.2010	31	62	97	31	35
VF7	29.01.2010	1.03.2010	5.04.2010	8	39	74	31	35
VF8	29.01.2010	1.03.2010	5.04.2010	15	46	81	31	35
VF9	29.01.2010	Morreu	Morreu					
VF10	29.01.2010	1.03.2010	5.04.2010	21	52	87	31	35
VF11	26.02.2010	5.04.2010	5.05.2010	34	72	102	38	30
VF12	26.02.2010	5.04.2010	5.05.2010	9	47	77	38	30
VF13	26.02.2010	5.04.2010	Morreu	13	49		38	
VF14	26.02.2010	Morreu	Morreu	11				
VF15	26.02.2010	Morreu	Morreu	8				
VF16	26.02.2010	5.04.2010	Morreu	18	56		38	
VF17	26.02.2010	5.04.2010	5.05.2010	23	61	91	38	30
VF18	26.02.2010	5.04.2010	5.05.2010	15	53	83	38	30
VF19	26.02.2010	5.04.2010	5.05.2010	24	62	92	38	30
VF20	26.02.2010	5.04.2010	Morreu	15	53		38	

Nº Ordem	Data de Colheitas			Idade (dias)			Intervalo entre Recolhas	
	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0-T1	T1-T2
VF21	26.02.2010	5.04.2010	5.05.2010	26	64	94	38	30
VF22	26.02.2010	5.04.2010	Morreu	20	58		38	
VF23	26.02.2010	5.04.2010	5.05.2010	21	59	89	38	30
VF24	26.02.2010	5.04.2010	Morreu	36	74		38	
VF25	26.02.2010	5.04.2010	Morreu	4	42		38	
VF26	26.02.2010	Morreu	Morreu	3				
VF27	26.02.2010	5.04.2010	5.05.2010	18	56	86	38	30
VF28	26.02.2010	5.04.2010	5.05.2010	11	49	79	38	30
VF29	26.02.2010	Morreu	Morreu	3				
VF30	26.02.2010	5.04.2010	Morreu	5	43		38	
VF31	26.02.2010	5.04.2010	5.05.2010	21	59	89	38	30
VF32	26.02.2010	5.04.2010	5.05.2010	5	43	73	38	30
VF33	26.02.2010	5.04.2010	5.05.2010	5	43	73	38	30
VF34	26.02.2010	5.04.2010	5.05.2010	13	51	81	38	30
VF35	26.02.2010	5.04.2010	5.05.2010	13	51	81	38	30
VF36	26.02.2010	5.04.2010	5.05.2010	2	40	70	38	30
VF37	26.02.2010	Morreu	Morreu	3				
VF38	26.02.2010	5.04.2010	5.05.2010	15	53	83	38	30
VF39	26.02.2010	5.04.2010	Morreu	32	70		38	
VF40	26.02.2010	5.04.2010	Morreu	59	97		38	
VF41	26.02.2010	Morreu	Morreu	8				
VF42	26.02.2010	5.04.2010	Morreu	7	45		38	
VF43	26.02.2010	5.04.2010	Morreu	23	61		38	

Nº Ordem	Data de Colheitas			Idade (dias)			Intervalo entre Recolhas	
	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0-T1	T1-T2
VF44	26.02.2010	Morreu	Morreu	3				
VF45	26.02.2010	Morreu	Morreu	14				
VF46	19.03.2010	22.04.2010	11.05.2010	17	51	70	34	30
VF47	19.03.2010	22.04.2010	Morreu	10	44		34	
VF48	19.03.2010	22.04.2010	11.05.2010	34	68	87	34	19
VF49	19.03.2010	22.04.2010	Morreu	7	41		34	
VF50	19.03.2010	22.04.2010	11.05.2010	20	54	73	34	19
VF51	19.03.2010	Morreu	Morreu	18				
VF52	19.03.2010	22.04.2010	Morreu	12	46		34	
VF53	19.03.2010	Morreu	Morreu	17				
VF54	19.03.2010	22.04.2010	11.05.2010	6	40	59	34	19
VF55	19.03.2010	22.04.2010	11.05.2010	7	41	60	34	19
VF56	19.03.2010	22.04.2010	11.05.2010	6	40	59	34	19
VF57	19.03.2010	Morreu	Morreu	21				
VF58	19.03.2010	Morreu	Morreu	24				
VF59	19.03.2010	22.04.2010	11.05.2010	25	59	78	34	19
VF60	19.03.2010	22.04.2010	11.05.2010	14	48	67	34	19
VF61	19.03.2010	22.04.2010	Morreu	15	49		34	
VF62	19.03.2010	Morreu	Morreu	17				
VF63	19.03.2010	Morreu	Morreu	34				
VF64	19.03.2010	22.04.2010	11.05.2010	18	52	71	34	19
VF65	19.03.2010	22.04.2010	11.05.2010	39	73	92	34	19
VF66	19.03.2010	22.04.2010	11.05.2010	23	57	76	34	19

Nº Ordem	Data de Colheitas			Idade (dias)			Intervalo entre Recolhas	
	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0-T1	T1-T2
VF67	26.03.2010	22.04.2010	11.05.2010	12	39	58	27	19
VF68	26.03.2010	22.04.2010	Morreu	13	40		27	
VF69	26.03.2010	22.04.2010	11.05.2010	12	39	58	27	19
VF70	26.03.2010	22.04.2010	Morreu	8	35		27	
VF71	26.03.2010	22.04.2010	11.05.2010	6	33	52	27	19
VF72	26.03.2010	22.04.2010	11.05.2010	11	38		27	
VF73	26.03.2010	Morreu	Morreu	4				
VF74	26.03.2010	Morreu	Morreu					
VF75	26.03.2010	Morreu	Morreu					
VF76	26.03.2010	22.04.2010	11.05.2010	11	38	57	27	19
VF77	26.03.2010	22.04.2010	11.05.2010	11	38	57	27	19
VF78	26.03.2010	22.04.2010	11.05.2010	8	35	54	27	19
VF79	26.03.2010	22.04.2010	Morreu	14	41		27	
VF80	26.03.2010	22.04.2010	11.05.2010	18	45	64	27	19
VF81	26.03.2010	22.04.2010	11.05.2010	20	47	66	27	19
VF82	26.03.2010	22.04.2010	11.05.2010	8	35	54	27	19
VF83	26.03.2010	Morreu	Morreu					
VF84	26.03.2010	22.04.2010	11.05.2010	9	36	55	27	19
VF85	26.03.2010	22.04.2010	11.05.2010	2	29	48	27	19
VF86	26.03.2010	22.04.2010	11.05.2010	20	47	66	27	19
VF87	26.03.2010	22.04.2010	11.05.2010	25	52	71	27	19
VF88	26.03.2010	22.04.2010	11.05.2010	27	54	73	27	19
VF89	26.03.2010	Morreu	Morreu	7				

Nº Ordem	Data de Colheitas			Idade (dias)			Intervalo entre Recolhas	
	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0-T1	T1-T2
VF90	26.03.2010	Morreu	Morreu	13				
VF91	26.03.2010	22.04.2010	11.05.2010	23	50	69	27	19
VF92	26.03.2010	22.04.2010	11.05.2010	7	34	53	27	19
VF93	26.03.2010	22.04.2010	Morreu	4	31		27	
VF94	26.03.2010	22.04.2010	11.05.2010	14	41	60	27	19
VF95	26.03.2010	Morreu	Morreu	14				
VF96	26.03.2010	22.04.2010	11.05.2010	9	36	55	27	19
VF97	26.03.2010	22.04.2010	Morreu	20	47		27	
VF98	26.03.2010	22.04.2010	11.05.2010	17	44	63	27	19
VF99	26.03.2010	22.04.2010	11.05.2010	16	43		27	
VF100	26.03.2010	22.04.2010	11.05.2010	25	52	71	27	19
VF101	26.03.2010	22.04.2010	11.05.2010	21	48		27	
VF102	26.03.2010	22.04.2010	Morreu	17	44		27	
VF103	26.03.2010	22.04.2010	11.05.2010	17	44	63	27	19
VF104	26.03.2010	22.04.2010	11.05.2010	15	42	61	27	19
VF105	26.03.2010	Morreu	Morreu	7				
VF106	26.03.2010	22.04.2010	11.05.2010	28	55	74	27	19

Anexo VI. Resultados dos testes de susceptibilidade a antibióticos das estirpes de *E. coli* em T0

	Amp	Amc	Xnl	Enr	Te	Sxt	Sinergismo
VF1	R	S	S	S	R	R	-
VF2	R	S	S	S	S	S	-
VF3	R	S	S	S	R	S	-
VF4	R	S	S	S	S	S	-
VF5	R	S	R	S	R	R	-
VF6	R	S	S	R	R	R	-
VF7	R	S	S	S	R	S	-
VF8	R	S	S	S	S	S	-
VF9	R	S	S	I	R	S	-
VF10	R	S	S	S	R	R	-
VF11	S	S	S	R	I	S	-
VF12	S	S	S	R	R	R	-
VF13	Negativo a <i>Escherichia coli</i>						
VF14	R	S	S	R	R	S	-
VF15	Negativo a <i>Escherichia coli</i>						
VF16	R	I	S	R	R	R	-
VF17	I	S	S	R	R	R	-
VF18	S	S	S	R	R	S	-
VF19	S	S	S	S	S	S	-
VF20	R	S	S	R	R	R	-
VF21	I	S	S	R	R	R	-
VF22	R	S	S	S	R	S	+
VF23	R	S	S	S	R	R	-
VF24	S	S	S	S	R	S	-
VF25	Negativo a <i>Escherichia coli</i>						
VF26	S	S	S	S	I	S	-
VF27	S	S	S	S	I	S	-
VF28	R	S	S	S	R	R	-
VF29	S	S	S	S	I	S	-
VF30	S	S	S	S	I	S	-
VF31	I	S	S	S	S	S	-
VF32	S	S	S	S	R	R	-
VF33	S	S	S	S	R	R	-
VF34	S	S	S	S	R	S	-
VF35	R	S	R	R	R	R	-

	Amp	Amc	Xnl	Enr	Te	Sxt	Sinergismo
VF36	S	S	S	S	R	R	-
VF37	S	S	S	S	I	S	-
VF38	R	S	I	S	R	R	+
VF39	S	S	S	S	R	S	-
VF40	R	S	S	S	R	R	-
VF41	S	S	S	S	R	R	-
VF42	R	S	R	S	R	S	+
VF43	S	S	S	S	S	S	-
VF44	S	S	S	S	R	S	+
VF45	R	S	S	S	R	S	-
VF46	R	S	S	S	R	R	-
VF47	R	S	S	S	R	R	-
VF48	R	S	S	S	R	R	-
VF49	S	S	S	S	I	S	-
VF50	S	S	S	S	S	S	-
VF51	S	S	S	S	R	S	-
VF52	R	S	R	S	R	R	+
VF53	R	S	S	S	R	R	-
VF54	R	S	S	R	I	R	-
VF55	R	S	R	S	R	R	-
VF56	R	S	S	S	R	S	-
VF57	R	S	R	S	R	R	+
VF58	R	S	R	S	R	R	+
VF59	R	S	S	R	R	R	-
VF60	R	S	I	S	R	R	+
VF61	R	S	I	R	R	R	-
VF62	R	S	R	R	R	S	+
VF63	R	S	S	R	R	S	-
VF64	R	S	S	R	R	R	-
VF65	R	S	S	R	R	R	-
VF66	R	S	S	R	R	R	-
VF67	R	S	R	R	R	R	+
VF68	R	S	R	R	R	S	-
VF69	R	S	R	S	R	R	+
VF70	R	S	R	R	R	R	+
VF71	R	S	R	R	R	R	+
VF72	R	S	R	S	R	R	+
VF73	R	S	S	S	R	R	-

	Amp	Amc	Xnl	Enr	Te	Sxt	Sinergismo
VF74	R	S	R	R	R	S	+
VF75	R	S	R	R	R	R	+
VF76	R	S	R	R	R	R	+
VF77	R	I	S	R	R	R	-
VF78	R	S	R	R	R	R	+
VF79	R	S	R	R	R	R	-
VF80	Negativo a <i>Escherichia coli</i>						
VF81	S	S	S	S	S	S	-
VF82	S	S	S	S	S	S	-
VF83	R	S	S	I	R	R	-
VF84	R	S	R	S	R	R	+
VF85	R	S	S	S	R	R	-
VF86	R	S	S	S	R	R	-
VF87	S	S	S	S	S	S	-
VF88	R	S	S	S	R	S	-
VF89	S	S	S	S	R	R	-
VF90	S	S	S	R	R	R	-
VF91	R	S	S	R	R	R	-
VF92	R	S	R	R	R	R	+
VF93	S	S	S	S	R	R	-
VF94	R	S	I	S	R	R	-
VF95	R	S	S	S	I	R	-
VF96	R	S	R	S	R	R	-
VF97	R	S	S	S	R	R	-
VF98	Negativo a <i>Escherichia coli</i>						
VF99	R	S	R	R	S	R	-
VF100	R	S	R	R	R	R	+
VF101	R	S	R	R	S	R	+
VF102	R	S	S	S	R	R	-
VF103	R	S	R	R	R	R	+
VF104	R	S	R	S	R	R	-
VF105	R	I	R	S	R	R	-
VF106	S	S	S	R	S	R	-

Abreviaturas: Amp, Ampicilina; Amc, Amoxicilina/Ácido clavulânico; Xnl, Ceftiofur;

Enr, Enrofloxacin; Te, Tetraciclina; Sxt, Trimetoprim/Sulfametoxazole

S, sensível; I, intermédio; R, resistente

Diâmetros de inibição interpretados de acordo com: CLSI, 2008

Sinergismo detectado pelo método de duplo disco

Anexo VII. Resultados dos testes de susceptibilidade a antibióticos das estirpes de *E. coli* em T1

	Amp	Amc	Xnl	Enr	Te	Sxt	Sinergismo
VF1	R	S	S	I	R	S	-
VF2	R	S	R	R	R	R	-
VF5	I	S	S	R	R	S	-
VF6	S	S	S	R	R	R	-
VF7	S	S	S	R	R	R	-
VF8	R	S	S	R	R	R	-
VF10	S	S	S	R	R	R	-
VF11	S	S	S	R	R	R	-
VF12	S	S	S	R	R	R	-
VF13	S	S	S	R	R	R	-
VF16	S	S	S	R	R	R	-
VF17	I	S	S	R	R	R	-
VF18	R	S	S	R	R	S	-
VF19	I	S	I	R	R	R	-
VF20	R	S	S	R	R	R	-
VF21	S	S	S	R	R	R	-
VF22	R	S	S	R	I	R	-
VF23	R	S	S	R	R	R	-
VF24	R	S	S	R	R	S	-
VF25	I	S	S	R	R	R	-
VF27	R	S	S	R	I	S	-
VF28	R	S	S	R	R	S	-
VF30	R	S	S	R	R	S	-
VF31	S	S	S	R	R	R	-
VF32	R	S	S	R	R	R	-
VF33	R	S	S	R	R	S	-
VF34	R	S	S	R	R	R	-
VF35	R	R	S	R	R	R	-
VF36	R	S	S	R	R	R	-
VF38	S	S	S	R	R	R	-
VF39	R	I	S	R	R	S	-
VF40	R	S	S	R	R	S	-
VF42	R	S	S	R	R	S	-
VF43	R	S	S	R	R	S	-
VF46	R	S	I	R	R	R	-
VF47	R	S	S	R	R	R	-
VF48	R	S	S	R	R	R	-

	Amp	Amc	Xnl	Enr	Te	Sxt	Sinergismo
VF49	R	S	S	R	I	R	-
VF50	R	S	S	R	R	R	-
VF52	R	S	S	R	R	R	-
VF54	R	S	S	R	R	R	-
VF55	Negativo a <i>Escherichia coli</i>						
VF56	R	S	S	R	R	R	-
VF59	Negativo a <i>Escherichia coli</i>						
VF60	R	S	S	R	R	R	-
VF61	R	S	R	R	R	R	-
VF64	R	S	S	R	R	R	-
VF65	R	S	S	R	R	R	-
VF66	R	I	S	R	R	R	-
VF67	R	S	R	R	R	S	-
VF68	R	S	S	R	R	R	-
VF69	R	S	S	R	R	R	-
VF70	R	S	S	R	R	S	-
VF71	S	S	S	R	R	R	-
VF72	R	I	S	R	R	R	-
VF76	R	S	S	R	R	R	-
VF77	R	I	S	R	R	R	-
VF78	R	S	S	R	R	R	-
VF79	R	S	S	R	R	R	-
VF80	R	I	S	R	R	R	-
VF81	R	S	S	R	R	R	-
VF82	R	S	S	R	R	R	-
VF84	R	S	S	R	R	S	-
VF85	R	I	S	R	R	R	-
VF86	R	S	S	R	R	R	-
VF87	R	S	S	R	R	R	-
VF88	R	S	S	R	R	S	-
VF91	R	S	S	R	R	R	-
VF92	R	S	S	R	S	S	-
VF93	R	S	S	R	R	R	-
VF94	R	S	S	R	R	R	-
VF96	R	S	S	R	R	R	-
VF97	R	S	S	R	R	R	-
VF98	R	S	S	R	R	R	-
VF99	R	I	S	R	R	R	-
VF100	R	S	S	R	R	R	-
VF101	R	S	S	R	R	R	-

	Amp	Amc	Xnl	Enr	Te	Sxt	Sinergismo
VF102	R	I	S	R	R	R	-
VF103	I	S	S	R	R	R	-
VF104	R	R	S	R	R	S	-
VF106	R	S	S	R	R	R	-

Abreviaturas: Amp, Ampicilina; Amc, Amoxicilina/Ácido clavulânico; Xnl, Ceftiofur;

Enr, Enrofloxacin; Te, Tetraciclina; Sxt, Trimetoprim/Sulfametoxazole

S, sensível; I, intermédio; R, resistente

Diâmetros de inibição interpretados de acordo com: CLSI, 2008

Sinergismo detectado pelo método de duplo disco

Anexo VIII. Resultados dos testes de susceptibilidade a antibióticos das estirpes de *E. coli* em T2

	Amp	Amc	Xnl	Enr	Te	Sxt	Sinergismo
VF1	I	S	S	R	R	R	-
VF2	R	S	S	R	R	R	-
VF5	R	S	S	R	R	R	-
VF6	R	S	S	S	R	R	-
VF7	S	S	S	R	R	R	-
VF8	R	S	S	R	R	R	-
VF10	R	S	S	R	R	S	-
VF11	R	S	S	S	R	S	-
VF12	R	S	S	R	R	R	-
VF17	Negativo a <i>Escherichia coli</i>						
VF18	R	S	R	S	R	S	+
VF19	R	S	S	R	R	R	-
VF21	S	S	S	R	R	R	-
VF23	R	S	S	R	R	R	-
VF27	R	S	S	R	R	S	-
VF28	R	S	R	R	R	S	+
VF31	R	S	R	R	R	R	+
VF32	R	S	S	R	R	R	-
VF33	R	S	S	S	R	S	-
VF34	Negativo a <i>Escherichia coli</i>						
VF35	R	S	R	I	S	R	+
VF36	R	S	I	R	R	R	-
VF38	R	S	S	R	R	R	-
VF46	R	S	R	R	R	R	+
VF48	R	I	S	S	R	S	-
VF50	R	S	S	R	R	R	-
VF54	R	I	S	S	R	R	-
VF55	R	S	S	R	R	R	-
VF56	R	S	R	R	R	R	+
VF59	R	S	S	R	R	R	+
VF60	R	S	S	R	R	R	-
VF64	R	S	S	R	R	R	-
VF65	R	S	S	R	R	R	-
VF66	R	I	S	R	R	R	-
VF67	S	S	S	S	S	S	-
VF69	R	I	S	R	R	R	-
VF71	R	S	S	S	R	S	-

	Amp	Amc	Xnl	Enr	Te	Sxt	Sinergismo
VF72	R	S	S	R	R	R	-
VF76	R	S	S	R	R	R	-
VF77	R	I	R	R	R	S	+
VF78	R	S	S	R	R	R	-
VF80	R	S	R	R	R	R	+
VF81	Negativo a <i>Escherichia coli</i>						
VF82	R	S	S	S	R	S	-
VF84	R	S	S	R	R	R	-
VF85	R	S	S	R	R	R	-
VF86	R	S	S	R	R	R	-
VF87	S	S	S	R	R	S	-
VF88	R	S	S	S	R	S	-
VF91	S	S	S	S	R	S	-
VF92	R	S	S	S	S	S	-
VF94	R	S	R	R	R	R	+
VF96	R	I	R	R	R	R	-
VF98	R	S	S	S	R	S	-
VF99	R	S	S	I	R	S	-
VF100	R	S	R	R	R	R	+
VF101	R	S	S	S	R	R	-
VF103	R	I	R	R	R	R	-
VF104	R	S	R	R	R	R	+
VF106	R	S	S	R	R	R	-

Abreviaturas: Amp, Ampicilina; Amc, Amoxicilina/Ácido clavulânico; Xnl, Ceftiofur;

Enr, Enrofloxacin; Te, Tetraciclina; Sxt, Trimetoprim/Sulfametoxazole

S, sensível; I, intermédio; R, resistente

Diâmetros de inibição interpretados de acordo com: CLSI, 2008

Sinergismo detectado pelo método de duplo disco

Anexo IX. Resultados dos testes de susceptibilidade a antibióticos dos 12 isolados de *Salmonella* spp.

	Amp	Amc	Xnl	Enr	Te	Sxt
VF3T0	S	S	S	S	S	S
VF4T0	R	I	S	S	R	S
VF5T0	R	I	S	S	R	S
VF7T0	R	S	S	S	R	S
VF90T0	R	S	S	S	R	R
	Amp	Amc	Xnl	Enr	Te	Sxt
VF12T2	S	S	S	S	R	S
VF17T2	S	S	S	S	I	S
VF23T2	S	S	S	S	I	S
VF31T2	S	S	S	S	I	S
VF38T2	S	S	S	S	I	S
VF64T2	S	S	S	I	R	S
VF85T2	S	S	S	I	R	S

Abreviaturas: Amp, Ampicilina; Amc, Amoxicilina/Ácido clavulânico; Xnl, Ceftiofur; Enr, Enrofloxacin; Te, Tetraciclina; Sxt, Trimetoprim /Sulfametoxazole

S, sensível; I, intermédio; R, resistente

Diâmetros de inibição interpretados de acordo com: CLSI, 2008